

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

**IMPLICATION DU GÈNE DE L'OBÉSITÉ (LEPTINE) ET
DE SON RÉCEPTEUR DANS LA FONCTION DES
CELLULES OVARIENNES CHEZ LE PORC**

par

Zulma Tatiana Ruiz-Cortés

Département de biomédecine vétérinaire

Faculté de médecine vétérinaire

**Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en sciences vétérinaires
option reproduction**

Décembre 2002

©Tatiana Ruiz-Cortés, 2002



SF
607
U54
2003
V.017



AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée

IMPLICATION DU GÈNE DE L'OBÉSITÉ (LEPTINE) ET
DE SON RÉCEPTEUR DANS LA FONCTION DES
CELLULES OVARIENNES CHEZ LE PORC

présentée par

Zulma Tatiana Ruiz-Cortés

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

C. Price , président-rapporteur

B. Murphy, directeur de recherche

J. Sirois, membre du jury

C.D. Walker, examinateur externe

A. Dallaire, représentant du doyen

RÉSUMÉ

La leptine, une hormone produite par le tissu adipeux, contrôle le poids corporel et la dépense énergétique. En plus de ces effets métaboliques, la leptine agit sur la reproduction en régulant, au niveau hypothalamique, la sécrétion de l'hormone de libération des hormones gonadotropines (GnRH), ce qui déclenche la libération des gonadotropines et entraîne le développement du tractus reproducteur et induit la puberté. La participation directe de la leptine à la fonction ovarienne a été postulée. En effet, les récepteurs ovariens de la leptine ont été décrits chez plusieurs espèces.

Les signaux intracellulaires de la leptine via les récepteurs ovariens sont mal connus. Dans d'autres tissus, un des premiers facteurs impliqué est une protéine appelée signal transducteur et activateur de la transcription (STAT-3). Il existe également d'autres gènes dont l'importance dans le métabolisme et la régulation des stéroïdes laisse supposer qu'ils participent à cette voie intracellulaire tout comme la protéine fixatrice de éléments régulateurs du stérol-1 (SREBP-1; *Sterol Regulatory Element Binding Protein*) connue pour ses effets sur un autre gène candidat, soit le gène de la protéine de régulation rapide de la stéroïdogénèse (StAR, *Steroid Acute Regulatory protein*).

L'objectif de notre travail était de déterminer la séquence et l'homologie du récepteur de la leptine, d'étudier sa distribution dans différents tissus porcins et de révéler le patron d'expression du message du récepteur de la leptine pendant la différenciation *in vivo* des cellules ovariennes tout au long de la phase lutéale et de le comparer au patron obtenu avec le modèle de lutéinisation *in vitro* des cellules de granulosa.

Enfin, nous avons étudié l'expression de la protéine du récepteur de la leptine dans les deux modèles.

Les données indiquent que l'expression du message du récepteur de leptine et sa protéine varient de façon similaire *in vivo* et *in vitro* pendant la lutéinisation des cellules de granulosa chez le porc : elle est faible dans le corps jaune (CL) postovulatoire, élevée dans le CL actif et minimale dans le CL en régression.

Nous avons produit de la leptine recombinante porcine et avons démontré les effets directs de cette leptine dans des cellules de granulosa porcine en culture. En ce qui a trait à la production de progestérone, à l'expression de la protéine SREBP-1 et à la transcription ou l'activation du promoteur du gène de la StAR après transfection des cellules de granulosa avec la forme active du SREBP-1, on observe un effet biphasique selon la dose de leptine employée: à faible dose elle a une action stimulante et à dose élevée une action inhibitrice. Par contre, dose faible ou élevée, on obtient toujours un effet stimulant sur l'expression de la protéine STAT-3. Nous concluons que le récepteur de la leptine se trouve dans les cellules ovariennes porcines et que son patron d'expression varie pendant la différenciation cellulaire. Après la fixation à son récepteur, la leptine module la stéroïdogénèse selon un mode biphasique et dose-dépendante par l'intermédiaire de la STAT-3. La voie d'induction de l'expression des protéines StAR par les protéines SREBP-1 fait partie de la cascade d'événements intracellulaires déclenchés par la leptine.

Mots clés : Leptine; récepteurs de leptine; cellules ovariennes porcines; lutéinisation; voies internes de signalisation

ABSTRACT

Leptin, a hormone produced by adipocytes, controls body weight and energy expenditure. Its role in reproduction includes important actions on the hypothalamus to induce release of gonadotropin releasing hormone, (GnRH), thereby triggering gonadotropin release and leading to development of the reproductive tract and induction of puberty. A direct involvement of leptin in ovarian function has been postulated. Indeed, the expression of leptin receptors has been shown in human, mouse, and rat ovaries.

The intracellular pathway triggered by leptin at the ovary level is not well known. In other tissues, the transcription factor, Signal of Transduction and Activation of Transcription-3 (STAT-3) has been found as one of the first elements in the cascade. There are other plausible candidate genes such as the Sterol Regulatory Element Binding Protein (SREBP-1) and the Steroid Acute Regulatory protein (StAR) since they are implicated in the regulation and metabolism of steroids. In addition, it is well known that SREBP-1 is a regulator of StAR expression, increasing the interest of studying these two proteins.

The purposes of our investigation were to determine the sequence and homologies with other species of the porcine leptin receptor, and its expression (the messenger RNA and protein levels) during *in vivo* and *in vitro* differentiation of ovarian cells.

Data indicate that leptin receptor mRNA and protein abundance vary during granulosa cells luteinization *in vitro* and in the corpus luteum (CL) during the pig luteal phase. We undertook the production and purification of recombinant porcine leptin and we demonstrated direct effects on

porcine granulosa cells in vitro. Indeed, when cells are treated with two different doses of leptin there is a biphasic effect (low doses being stimulatory and high doses inhibitory) on progesterone accumulation, SREBP-1 protein abundance and in the activation of transcription of the StAR promoter in granulosa cells co-transfected with the active form of SREBP-1. Concerning the STAT-3 protein, both low and high doses seem to stimulate its expression.

We conclude that leptin receptor is expressed in granulosa and luteal cells, and varies during pig ovarian cell differentiation. After binding to its receptor, leptin, acting through STAT-3, modulates steroidogenesis in a biphasic and dose-dependent manner, and SREBP-1 induction of StAR expression may be in the cascade of regulatory events.

Key words : porcine granulosa cells; luteinization; porcine leptin; porcine leptin receptor; intracellular pathways

REMERCIEMENTS

Je désire remercier sincèrement mon directeur de recherche, le docteur Bruce D. Murphy. Il m'a fourni un excellent encadrement scientifique, a contribué à soutenir ma motivation pour la recherche et a su favoriser une ambiance humaine stimulante dans son groupe de travail.

Je remercie du fond du coeur ma mère Gloria, mon père Hernando, mes soeurs Mónica et Marcela ainsi que mon frère Juan Carlos pour leur appui moral inconditionnel.

Un remerciement spécial pour Mira Dobias : son aide technique, ses conseils pertinents et son esprit analytique ont été d'un grand secours.

Un grand merci aussi pour mes collègues et amis : Nazario Pescador, Jian Hua Song, Dan Lacroix, Nicolas Gévry, Joëlle Desmarais, Sandra Ledoux, Éric Deneault, Flavia Lopes, Leonor Miranda, Malha Sahmi et Mélanie Hamel pour avoir partagé leur goût pour la recherche avec moi.

Je veux souligner également la précieuse contribution de mesdames Micheline Saint-Germain, Micheline Sicotte et Hélène Boucher et Odette Hélie.

Enfin, j'aimerais remercier la Fundación para el Futuro de Colombia (COLFUTURO) de l'Université d'Antioquia de l'Université de Montréal et la Fédération des associations étudiantes du campus de l'Université de Montréal pour son soutien financier au cours de ces dernières années ainsi que le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et Génie (CRSNG) de Canada pour l'appui du projet de recherche.

AVANT-PROPOS

Cette thèse est présentée à la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal pour l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* en sciences vétérinaires. Elle est composée d'une introduction générale et d'une revue de littérature en anglais (article de révision soumis) et en français, suivie par d'autres manuscrits scientifiques qui ont été publiés dans des revues scientifiques internationales de langue anglaise et qui constituent l'œuvre de la thèse. Ceux-ci sont précédés d'un court résumé en français. Une discussion générale et les conclusions en français résument finalement les aspects les plus importants des études décrites.

Le focus de la revue de littérature de cette thèse (Chapitre I) est dirigé spécifiquement vers la leptine, ses récepteurs et les anomalies plus communes, son mode d'action et finalement deux des gènes candidats à être régulés par la leptine sont mentionnés. Par la suite on passe en révision le tissu adipeux, les facteurs qu'y sont sécrétés en mettant l'emphasis sur la leptine, et leurs effets sur le système reproducteur.

Le corps de la thèse comprends deux parties : la première (Chapitre II) traite des récepteurs de leptine, leurs caractéristiques moléculaires et leur patron d'expression dans l'ovaire porcin. La deuxième partie (Chapitre III) décrit les effets directs de la leptine dans les cellules ovariennes et les possibles voies intracellulaires déclenchées par l'activation du récepteur *in vitro*.

La discussion générale et les conclusions de la thèse résument les contributions les plus importantes de ces travaux à la compréhension des mécanismes moléculaires en jeu dans l'interface nutrition-reproduction,

plus spécifiquement des effets stimulateurs et/ou inhibiteurs de la leptine dans les cellules ovariennes porcines. Les directions futures de cette étude sont incluses dans la discussion générale.

Les références citées dans l'introduction, la revue de littérature et la discussion générale sont énumérées à la fin de la thèse.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	v
REMERCIEMENTS	vii
AVANT-PROPOS	viii
TABLE DES MATIÈRES	x
LISTE DES TABLEAUX	xiii
LISTE DES FIGURES	xiv
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xvi
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I	5
RECENSION DE LA LITTÉRATURE	5
RÉCEPTEUR À LA LEPTINE	5
Isoformes	5
Voies intracellulaires	7
DIABÈTE ET OBÉSITÉ	9
MODE D'ACTION DE LA LEPTINE	12
Balance énergétique	12
Système immunitaire	12
Angiogenèse	13
PROTÉINES FIXATRICES DES ÉLÉMENTS	
RÉGULATEURS DU STÉROL-1 (SREBP-1)	14
PROTÉINE DE RÉGULATION RAPIDE DE LA	
STÉROÏDOGENÈSE (STAR)	15
ADIPOSE TISSUE REGULATION OF REPRODUCTION	18
PAGE TITRE DU TIRÉ-À-PART	19
RÉSUMÉ	20
ABSTRACT	21
INTRODUCTION	21
STRUCTURE AND ONTOGENESE	
OF ADIPOSE TISSUE	22
NUTRITIONAL AND HORMONAL REGULATION OF	
ADIPOSE TISSUE	24
ENDOCRINE FACTORS SECRETED BY ADIPOSE TISSUE	25
Leptin	26
Effects of leptin on the hypothalamo-hypophyseal	
component of the reproductive axis	26
Effects of leptin on the gonads	28
Is leptin a primary or a permissive signal for	
reproductive events?	29
Resistin	31

Adiponectin	32
Acylation stimulating protein (ASP) and adipsin	33
PPAR angiopoietin related (PGAR) or fasting induced adipose factor (FIAF).....	34
MODELS FOR ADIPOSE TISSUE MODULATION OF REPRODUCTIVE FUNCTION	34
REFERENCES	39
OBJECTIFS ET HYPOTHÈSE DE TRAVAIL	61
CHAPITRE II	62
PORCINE LEPTIN RÉCEPTOR : MOLECULAR STRUCTURE AND EXPRESSION IN THE OVARY	62
PAGE TITRE DU TIRÉ-À-PART	63
RÉSUMÉ.....	64
ABSTRACT	65
INTRODUCTION	66
MATERIALS AND METHODS	68
Tissue collection and cell culture	68
Leptin receptor cloning and sequencing	69
Oligonucleotides primers	70
RNA analysis	70
Leptin receptor protein analysis	71
Statistical analyses	72
RESULTS	72
DISCUSSION.....	75
ACKNOWLEDGMENTS.....	81
REFERENCES	81
CHAPITRE III	100
BIPHASIC EFFECTS OF LEPTIN IN PORCINE GRANULOSA CELLS	100
PAGE TITRE DU TIRÉ-À-PART	101
RÉSUMÉ.....	102
ABSTRACT	103
INTRODUCTION	103
MATERIALS AND METHODS	106
Cell culture	106
Determination of granulosa cell viability	106
Recombinant porcine leptin production and purification.....	107
Progesterone radioimmunoassay (RIA).....	109
Immunoblotting	109
Transient transfection assays.....	111
Statistical analyses	112
RESULTS.....	112
DISCUSSION.....	116

ACKNOWLEDGMENTS.....	121
REFERENCES	121
DISCUSSION GÉNÉRALE	143
Le paradigme porcin	143
Interface nutrition-reproduction	145
Récepteurs et isoformes	146
Récepteurs et fonction lutéale	148
La leptine et la commande métabolique de la reproduction	150
Effets inhibiteurs de la leptine sur la stéroïdogénèse	152
Stimulation de la stéroïdogénèse par la leptine.....	154
Leptine comme facteur de croissance ou signal de prolifération...	154
Voie intracellulaire	156
Directions futures.....	158
CONCLUSION	164
BIBLIOGRAPHIE	167

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre I

Tableau I. Adipose secretory elements and their roles in reproductive and other biological processes.....	51
--	----

Chapitre II

Tableau I. Oligonucleotide primers used in RT-PCR to generate amplicons of pig leptin receptor (Lept-r) used for sequencing.....	87
--	----

LISTE DES FIGURES

Chapitre I

- Figure 1. Épissage alternatif du récepteur de leptine 53
- Figure 2. Sites and mode of action of leptin in the mammalian hypothalamo-hypophysial-gonadal axis 55
- Figure 3. Leptin has direct effects on the gonads 57
- Figure 4. Simplified model to explain the effects of Malnutrition or fasting and refeeding on ovulation rates in litter bearing species 59

Chapitre II

- Figure 1. Domain structure of the pig leptin receptor based on alignment of its deduced amino acid sequence with that of the human receptor 89
- Figure 2. Homology of the porcine leptin receptor with complete and partial sequences on other mammalian species 91
- Figure 3. Northern analysis demonstrating the tissue distribution of leptin receptor transcripts as revealed by hybridization with a 1.3 kb probe 93
- Figure 4. Northern analysis demonstrating the relative abundance of leptin receptor mRNA in porcine corpora lutea through the estrous cycle 95
- Figure 5. Pattern of abundance of leptin receptor transcripts during *in vitro* luteinization of porcine granulosa cells. Immunoblot of proteins from porcine granulosa cells during *in vitro* luteinization 97

Chapitre III

- Figure 1. Analysis of the expression and purification of recombinant porcine leptin 127

- Figure 2. Progesterone accumulation in porcine granulosa cells in culture over 12, 24 and 48 h after incubation with medium alone, 10 ng/ml or 1000 ng/ml leptin 129
- Figure 3. Progesterone accumulation in porcine granulosa cell cultures terminated at 48 h after incubation with medium alone (control), leptin (10 and 1000 ng/ml), IGF-I (100 ng/ml) and FSH (100 ng/ml) or with combinations of high and low leptin doses with FSH, IGF-I and FSH+IGF-1 131
- Figure 4. Analysis of the porcine granulosa cell cycle using flow cytometry. Granulosa cell cultures were terminated at 48 h after incubation with medium alone (control), medium + 10 ng/ml leptin, medium + 1000 ng/ml leptin 133
- Figure 5. Immunoblot showing the time course of expression of phosphorylated STAT-3 protein in primary cultures of porcine granulosa cells treated with 10 or 1000 ng/ml recombinant porcine leptin for 5 to 30 min beginning at 48 h after initiation of culture 135
- Figure 6. Western analysis demonstrating the relative protein abundance of phosphorylated STAT-3 in porcine granulosa cells cultured for 12, 24 or 48 h and then treated for 15 min with 0, 10, or 1000 ng/ml leptin 137
- Figure 7. Immunoblot of proteins SREBP1 from porcine granulosa cells over 12, 24, and 48 h in culture treated with 10 or 1000 ng/ml of porcine recombinant leptin 139
- Figure 8. Mean (\pm SEM) corrected luciferase activity in primary porcine granulosa cells transiently transfected with the porcine StAR promoter-luciferase construct, the active form of SREBP-1 or the promoterless luciferase plasmid, pGL3-basic. Cells were cotransfected with simian virus 40 *Renilla*-luciferase control vector to correct for transfection efficiency 141

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

aa	Acides aminés
ADD-1	Isoforme de SREBP-1 (SREBP-1c)
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNi	Acide ribonucléique d'interférence
BAT	Tissu adipeux brun
<i>c-fos</i>	Gène activé de manière immédiate
<i>c-jun</i>	Gène activé de manière immédiate
CL	Corps jaune (<i>Corpus luteum</i>)
CSF	Fluide céphalo-rachidien
DEDCT	Diethyldithiocarbamate
<i>db/db</i>	Souris homozygotes diabétiques avec mutation du gène OB-R
<i>egr-1</i>	Gène activé de manière immédiate
ERK	Kinase régulée par des signaux extracellulaires
<i>fa/fa</i>	Rats homozygotes gras avec mutation du gène OB-R
FSH	Hormone stimulante de la folliculogenèse
GHR	Récepteur de l'hormone de croissance
GHRH	Hormone libératrice de l'hormone de croissance
GnRH	Hormone libératrice des gonadotropines
ICV	Intracerveau-ventriculaire
IGF-I	Facteur de croissance de type insulinique I
IL-6	Interleukine-6
IRS-1	Substrat de récepteur de type insulinique-1
JAK	Kinase Janus
kb	kilo bases
kDa	kilo Daltons
LDL	Lipoprotéines de faible densité
Lept	Protéine de l'obésité ou leptine
Lept-r	Récepteur de la leptine
LPS	Complexes glucido-lipido-protéiques
LPL	Lipoprotéine lipase
Mt	Millions de tonnes
MAPK	Protéine kinase activée par l'activité mitogène
NF-Y	Facteur nucléaire-Y
NPY	Neuropeptide Y
nt	Nucléotides
OB	Protéine de l'obésité ou leptine
OB-R	Récepteur à la leptine
<i>ob/ob</i>	Souris homozygotes avec mutation du gène <i>ob</i> (protéine OB)

P4	Progestérone
P450 _{scc}	Enzyme cytochrome P450 coupant la chaîne latérale
PPAR	Récepteur activé par le proliférateur de péroxysome
POMC	Proopiomélanocortine
QTL	Locus de traits quantitatifs
RIA	Radio-immuno-essai
RT-PCR	Transcription inversée-réaction en chaîne de polymérase
SF-1	Facteur stéroïdogénique de type 1
SH2	Domaine d'homologie avec Src; domaine de liaison de phosphotyrosine
SHP-2	Phosphatase contenant le site SH2; tyrosine phosphatase
SOCS-3	Suppresseurs de la signalisation des cytokines-3
Sp1	Facteur de transcription (cofacteur)
STAT-3	Signal transducteur et activateur de la transcription-3
StAR	Protéine de régulation rapide de la stéroïdogénèse
SREBP-1	Protéines fixatrices des éléments régulateurs du stérol-1
SRE	Site de liaison pour les SREBPs dans les régions du promoteur
SS	Somatostatine
TGF- β	Facteur de croissance transformant- β
TNF- α	Facteur tumoral de nécrose- α
WAT	Tissu adipeux blanc

INTRODUCTION

Le poids et la composition corporelle sont déterminés par une interaction complexe entre les facteurs génétiques, environnementaux, comportementaux et même sociaux. Il n'existe pas de modèle spécifique pour l'étude de ce système d'interactions (Considine and Caro, 1997). Pour cette raison, la plupart des chercheurs se sont intéressés au modèle de rétrocontrôle négatif pour décrire la régulation du poids corporel avec des variables simples. Il y a déjà cinquante ans que Kennedy (1953) a proposé un modèle dans lequel on retrouve un facteur de régulation du poids corporel, en particulier de la quantité de tissu adipeux. Ce facteur serait un signal pour maintenir l'équilibre énergétique corporel et la stabilité de la composition corporelle. C'est ce qu'on a appelé la théorie lipostatique. Malheureusement, l'isolement du facteur circulant relié au tissu adipeux et donc la validation de la théorie lipostatique se sont avérés difficiles. On s'est alors tourné vers la génétique moléculaire pour rechercher les mutations génétiques en cause chez les souris obèses *ob/ob* et *db/db* (diabétiques), qui présentent un problème évident d'équilibre énergétique. La découverte du gène *ob* et de la protéine codée par celui-ci, la leptine, a fourni le chaînon manquant de la théorie lipostatique. Par la suite, la découverte du gène *db* responsable de coder le récepteur de la leptine a non seulement constitué une indication additionnelle de la validité de la théorie, mais a aussi ouvert de nouvelles avenues pour l'étude du complexe système de régulation du métabolisme énergétique.

La leptine a été découverte en 1994 (Zhang *et al.*, 1994). Protéine de 16 kDa constituée de 146 acides aminés, elle est synthétisée essentiellement par le tissu adipeux (blanc, WAT et brun, BAT) et sécrétée

de manière systémique après le clivage de son peptide de signal de 21 acides aminés.

Cependant, les ARNm et/ou la protéine du gène de la leptine sont aussi produits par le placenta, des tissus fœtaux, la muqueuse gastrique et les cellules étoilées hépatiques. De cette manière l'hormone peut participer à plusieurs fonctions physiologiques comme la croissance fœtale, la satiété dérivée de l'intestin, les réponses immunitaires ou proinflammatoires, l'absorption intestinale, l'angiogenèse et la lipolyse (Marti *et al.*, 1999). Rapidement, des preuves se sont accumulées sur le rôle crucial de la protéine OB dans le contrôle des réserves adipeuses de l'organisme à travers une régulation coordonnée du comportement alimentaire, du métabolisme, du système nerveux autonome et de l'équilibre énergétique corporel chez les rongeurs, les primates et l'homme (Campfield *et al.*, 1997).

Les récepteurs de la leptine ont été retrouvés dans les centres hypothalamiques responsables de la satiété (Tartaglia *et al.*, 1995). De plus, les récepteurs de la leptine sont largement présents dans les tissus des mammifères (foie, cœur, reins, poumons, intestin grêle, testicules, ovaires, rate, pancréas et tissu adipeux) (Lee *et al.*, 1996). Au niveau périphérique, la leptine agit donc sur des processus fondamentaux du métabolisme et de la reproduction (Fruhbeck *et al.*, 1998).

L'épissage alternatif du récepteur de la leptine amène la production de multiples isoformes qui contiennent un domaine extra-cellulaire commun (Banks *et al.*, 2000; Fei *et al.*, 1997) et des domaines intracellulaires de différentes longueurs. La forme la plus longue du récepteur de la leptine, la forme b, est membre de la famille des récepteurs

des interleukines (IL)-6 de classe I (Baumann *et al.*, 1996; Tartaglia, 1997). Elle est la seule isoforme avec des résidus de tyrosine dans son domaine intracellulaire, résidus qui servent de cible pour la phosphorylation (Tartaglia, 1997). Cette isoforme est fortement exprimée dans l'ovaire porcin et son domaine cytoplasmique renfermerait des régions de liaison à la Janus kinase (JAK) ainsi que la séquence pour la liaison des signaux transducteurs et activateurs de la transcription (STAT) (Baumann *et al.*, 1996).

La stéroïdogenèse repose sur la disponibilité de son précurseur, le cholestérol dérivé de sources extracellulaires et intracellulaires. Les niveaux intracellulaires sont étroitement liés à l'activité d'une famille unique de facteurs de transcription connus sous le nom de protéines fixatrices des éléments régulateurs du stérol (SREBP)(Hua *et al.*, 1993). Lorsque la concentration intracellulaire de stérol/cholestérol est suffisante, on retrouve les précurseurs (inactifs) de 125-kDa de ces facteurs de transcription dans le réticulum endoplasmique. En cas de déplétion du cholestérol, ces précurseurs sont clivés par des protéases, ce qui libère un régulateur actif de transcription de 68 kDa. Cette forme active de SREBP pénètre dans le noyau où elle va s'unir aux régions régulatrices de stérol (SRE) qui se trouvent dans les promoteurs des gènes en charge de l'homéostasie et du transport du cholestérol (Brown and Goldstein, 1997).

La leptine circulante influence le profil d'expression des gènes et le phénotype du tissu adipeux blanc. Il a d'ailleurs été démontré récemment que la leptine modulait l'activité des SREBP-1 par l'inhibition de la synthèse des ARNm et de la protéine active lors des études avec des techniques de *microarrays* avec de l'ADN de tissu adipeux provenant de rats ayant été soumis à des différentes diètes et traitements à la leptine

(Soukas *et al.*, 2000). Parmi les agroupements de gènes (clusters) étudiés, celui auquel appartient la SREBP-1 et d'autres gènes impliqués dans la homéostasie du cholestérol a été en plus vérifié par des analyses de type Northern blot.

Hormis l'apparente activation du c-jun et l'inhibition de la glucocorticoïde kinase sérique ou SGK (Barkan *et al.*, 1999), on connaît peu les gènes cibles de la leptine dans l'ovaire. L'influence de la leptine sur la synthèse des stéroïdes est bien documentée. Le gène de régulation rapide de la stéroïdogenèse (StAR) serait donc un candidat plausible à la régulation par la leptine. Par ailleurs, il a également été démontré récemment que les SREBP-1 assuraient la régulation de la StAR (Shea-Eaton *et al.*, 2001).

Les objectifs généraux de cette étude sont :

- Explorer chez les mammifères la régulation de la reproduction, par le tissu adipeux, par ses produits de sécrétion et plus particulièrement par la leptine. L'accent est mis sur les mécanismes connus ou non à ce jour par lesquels cette régulation peut être exercée.
- Vérifier l'expression du récepteur de la leptine porcine dans des cellules ovariennes.
- Améliorer notre compréhension des mécanismes d'action intracellulaire de la leptine dans l'ovaire porcin à l'aide de cultures de cellules de granulosa.

CHAPITRE I

RECENSION DE LA LITTÉRATURE

RÉCEPTEURS DE LA PROTÉINE OB, OB-R

La leptine agit par l'intermédiaire de ses récepteurs qui présentent une forte homologie avec la famille des récepteurs des cytokines de classe I, de manière considérable avec la sous-unité gp130 de l'interleukine 6, IL-6. Des études montrent que ces récepteurs subissent l'homodimérisation après la liaison du ligand (Nakashima *et al.*, 1997; White *et al.*, 1997), ce qui suggère que la signalisation déclenchée par les récepteurs de la leptine ne nécessite pas d'autres subunités de signal de transduction. Ces récepteurs appartiennent à la sous-famille des récepteurs de l'hormone de croissance, comme les récepteurs de l'érythropoïétine, les récepteurs de la prolactine et les récepteurs du facteur stimulant des colonies de granulocytes, tous activés par homodimérisation. Par contre, la signalisation par d'autres membres de la famille des récepteurs des cytokines de classe I est induite par la formation de complexes hétéro-oligomériques (Heldin, 1995).

Isoformes

Il existe au moins cinq isoformes du récepteur de la leptine (Lee *et al.*, 1996; Tartaglia *et al.*, 1995), résultat de l'épissage alternatif de l'ARNm. Un récepteur, l'OB-Rb, est qualifié d'isoforme longue en raison de son domaine intracellulaire de 302 acides aminés alors que les quatre autres sont dits isoformes courtes (OB-Ra,c, d, et f) puisque leur séquence cytoplasmique comprend entre 32 et 40 acides aminés. Ces cinq isoformes ont des domaines extracellulaire et transmembranaire identiques. En outre, les 29 premiers acides aminés (aa) du domaine cytoplasmique sont

également identiques chez les cinq isoformes. Les résidus supplémentaires du domaine cytoplasmique des isoformes b, a, c, d, et f, qui sont respectivement de 275, 3, 5, 11 et 6 aa, sont générés par épissage alternatif et codés par des exons différents (Fei *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996). On a aussi découvert un récepteur soluble (OB-Re) dépourvu de région transmembranaire et qui agirait comme une protéine de liaison de la leptine circulante (Gavrilova *et al.*, 1997). La région de 29 aa commune aux 5 isoformes du récepteur et fixée à la membrane contient un motif de boîte 1 (*Box 1*) hautement conservé chez la plupart des membres de la famille des récepteurs des cytokines (Murakami *et al.*, 1991).

Habituellement, cette région est située dans les 20 premiers résidus du domaine cytoplasmique. Le motif de la boîte 2 (*Box 2*), moins conservé, se retrouve aussi dans plusieurs récepteurs de la famille. Il se situe entre les premiers 50 à 60 aa du domaine intracellulaire et est présent uniquement dans l'isoforme longue du récepteur de la leptine (Ghilardi and Skoda, 1997; Murakami *et al.*, 1991). Quelques aspects des isoformes de la leptine mentionnés sont résumés dans la figure 1.

En ce qui concerne le patron de distribution des différentes isoformes, il est intéressant de constater qu'il diffère beaucoup entre la forme longue (OB-Rb) et deux des formes courtes (a et f) chez le rat. En effet, l'OB-Ra est relativement abondante dans le cerveau, le foie, l'estomac, les reins, les poumons, le coeur, et l'hypothalamus; mais en faible quantité dans les testicules et la rate et indétectable dans le thymus. Les récepteurs de l'OB-Rb sont très abondants dans le cerveau et l'hypothalamus, peu abondants dans l'estomac, la rate, les poumons, le thymus et le coeur et indétectables dans le foie, les reins et les testicules. Les isoformes OB-Rf sont faiblement présentes dans les testicules et

moyennement à fortement exprimées dans le cerveau, le foie, l'estomac, les reins, les poumons, le thymus, la rate et l'hypothalamus (Wang *et al.*, 1996).

Fait intéressant, Uotani et ses collaborateurs (1999) ont étudié les propriétés fonctionnelles des récepteurs de la leptine et sont arrivés à la conclusion que les isoformes OB-Ra et OB-Rb servent d'intermédiaires pour l'internalisation de la leptine. Le mécanisme est équivalent à celui des récepteurs des LDL. Il assure la dégradation du récepteur de la leptine par une voie lysosomale. Fait à noter, la régulation négative de l'expression de ces récepteurs est induite par le ligand lui-même, soit la leptine (Uotani *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1997).

Voies intracellulaires

Les analyses des mutations de la boîte 1 et de la boîte 2, des structures conservées dans plusieurs récepteurs comme nous l'avons déjà mentionné, ont indiqué que ces deux domaines sont nécessaires à l'interaction et l'activation des tyrosine kinases de la famille des Janus kinases ainsi que pour poursuivre les signaux intracellulaires déclenchés par le récepteur activé (Baumann *et al.*, 1996; Murakami *et al.*, 1991). Comme les isoformes courtes ne possèdent pas la séquence correspondante à la boîte 2, on a suggéré que ces isoformes étaient inactives (Ghilardi and Skoda, 1997; Lee *et al.*, 1996; Tartaglia *et al.*, 1995; Tartaglia, 1997; White *et al.*, 1997). En fait, les formes courtes de l'OB-R sont incapables de stimuler les voies activées par la forme longue (Baumann *et al.*, 1996; Ghilardi *et al.*, 1996). Cependant, dans certains cas, des récepteurs des cytokines de la sous-famille GHR qui présentent une mutation de la boîte 2 et/ou seulement une courte région intracellulaire, ont la capacité de déclencher des voies intracellulaires (Baumann *et al.*, 1996; Joneja and

Wojchowski, 1997). En outre, plusieurs membres de la famille du récepteur de la leptine peuvent activer des voies intracellulaires différentes de celles qui sont associées à l'activation des JAK-STAT (Ihle *et al.*, 1995).

Une quantité considérable de travail a été accomplie en vue d'élucider ces voies intracellulaires sous la commande de la leptine. Les membres de la famille Janus kinase (JAK), les signaux transducteurs, les activateurs de la transcription (STAT) et les voies des kinases activées par l'activité mitogène/ kinase sous la commande des signaux extracellulaires (MAPK/ERK) ont été impliqués dans le signal de transduction médié par le récepteur de la leptine (Banks *et al.*, 2000; Baumann *et al.*, 1996; Bjorbaek *et al.*, 1997; Ghilardi *et al.*, 1996; O'Rourke and Shepherd, 2002; Rosenblum *et al.*, 1996; Yamashita *et al.*, 1998). Des études de transfection ont démontré que la liaison du ligand à l'OB-R provoque l'activation de la voie JAK-STAT (Ghilardi and Skoda, 1997). Par ailleurs, l'administration de leptine aux souris femelles obèses *ob/ob* et *+/+* (type sauvage) a entraîné l'activation des STAT-3 hypothalamiques. D'autre part, la leptine de souris *db/db* (OB-Rb tronquées) est incapable d'induire l'activation des STAT-3 en raison de l'absence du motif YXXQ (consensus pour la liaison des STAT-3 ou boîte 3) dans le domaine cytoplasmique (Tartaglia *et al.*, 1995). Des études plus récentes ont démontré que les facteurs de transcription nucléaires *c-fos*, *c-jun* et *egr-1* font partie du système de signalisation de la leptine (Bjorbaek *et al.*, 2001; Murakami *et al.*, 1997; Uotani *et al.*, 1999).

Comme le soulignent Brann et ses collaborateurs (Brann *et al.*, 2002), on en sait beaucoup sur les voies commandées par la leptine, mais bien peu sur les facteurs limitants du système de signalisation de la leptine. De récentes études ont démontré que les STAT-3 induisaient la transcription génique des suppresseurs de la signalisation des cytokines-3 (SOCS-3) (Bjorbaek *et*

al., 1999). La surexpression des SOCS-3 provoque l'inhibition de la phosphorylation des JAK2 induite par la leptine et empêche donc l'activation subséquente de la voie JAK/STAT. De même, les SOCS-3 bloquent la tyrosine phosphorylée Tyr-985 ce qui empêche toute interaction de ce résidu avec les phosphotyrosine protéine phosphatases ou SHP-2, qui renferment un domaine SH2 (Li and Friedman, 1999). Le rôle exact des SHP-2 dans la signalisation de la leptine demeure nébuleux et les données à cet égard sont contradictoires (Bjorbaek *et al.*, 2000; Carpenter *et al.*, 1998). Les SOCS-3 sont des inhibiteurs de la voie intracellulaire déclenchée par la leptine *in vivo* et ils sont à leur tour régulés par la leptine elle-même. Une excessive activité des SOCS-3 dans des cellules cibles du gène de l'obésité est alors un potentiel mécanisme de résistance à la leptine, caractéristique de l'obésité chez les humains, par exemple (Bjorbaek *et al.*, 1999).

En résumé, on pourrait conclure que le système de signalisation de la leptine joue un rôle de médiateur dans les voies JAK/STAT et MAPK/ERK et que les SOCS-3 servent de facteur limitant de l'action de la leptine.

Diabète et obésité

Les syndromes d'obésité et de diabète sont le résultat de deux mutations récessives autosomiques : *obèse (ob)* et *diabète (db)* (Takaya *et al.*, 1996). L'hyperglycémie caractéristique du diabète type II (non insulino-dépendant) ne résulte pas d'un problème de régulation, mais constitue plutôt une réponse adaptative au malfonctionnement des cellules beta et à la résistance à l'insuline. De même, l'obésité a été décrite comme le résultat d'un déséquilibre entre la prise alimentaire et la dépense énergétique et non comme un problème de prise alimentaire excessive (Porte *et al.*, 1998).

L'obésité des souris *ob/ob* est imputable à une défaillance de la production de leptine et un traitement à la leptine permet de renverser, chez ces sujets, le syndrome d'hyperphagie, d'altération de la reproduction, de diminution de la thermogenèse, de diabète et de croissance réduite. En 1997, la naissance du premier enfant humain avec une mutation homozygote du gène *ob* (carence en leptine) a été rapporté (Montague *et al.*, 1997). Cette mutation apparemment rare est associée à un poids normal à la naissance puis à l'apparition d'une obésité progressive, ce qui vient appuyer l'idée du rôle crucial de la leptine dans la régulation de l'adiposité du corps humain. La leptine circule à des concentrations directement proportionnelles à l'adiposité chez les animaux et les humains (Maffei *et al.*, 1995) et elle est en relation étroite avec la quantité de gras et d'insuline. Cependant, la corrélation est plus forte avec la quantité totale de gras qu'avec la sensibilité à l'insuline (Schwartz *et al.*, 1997).

Tout comme l'insuline, la leptine est présente dans le liquide céphalorachidien (LCR) à des niveaux relativement faibles, soit moins de 10% de la concentration plasmatique (Schwartz *et al.*, 1996). Le rapport leptine LCR/plasmatique diminue lorsque les niveaux plasmatiques augmentent, ce qui correspond à un mécanisme de saturation similaire à celui de l'insuline (Porte *et al.*, 1998).

Comme c'est le cas avec les récepteurs de l'insuline, les récepteurs de la leptine sont particulièrement abondants dans le plexus choroïde, mais moins abondants dans l'hypothalamus (Tartaglia, 1997). Si le système de transport de la leptine est analogue à celui de l'insuline, lequel est basé sur de très faibles niveaux dans le LCR, les récepteurs de la leptine dans le plexus choroïde auraient plutôt une fonction de transport ou de dégradation de la leptine du LCR que de médiateur de l'absorption de leptine à partir du plasma. Plusieurs auteurs ont démontré que la capture de leptine par le

cerveau se fait plutôt par la voie de la barrière hémato-encéphalique par l'intermédiaire des récepteurs dans l'endothélium (Golden *et al.*, 1997). Des mutations du récepteur de la leptine sont responsables des phénotypes *db/db* des souris et *fa/fa* des rats. La première mutation se produit dans le domaine intracellulaire et la deuxième, au niveau extracellulaire, mais les deux causent une signalisation anormale et une résistance à la leptine (Chua *et al.*, 1996). Le traitement à la leptine n'amène pas le renversement du syndrome (Campfield *et al.*, 1995; Halaas *et al.*, 1995; Seeley *et al.*, 1997) observé chez les souris *db/db* et les rats *fa/fa* comme il le fait chez les souris *ob/ob*.

Les souris déficientes en leptine (*ob/ob*) et les souris et les rats résistants à la leptine (*db/db* et *fa/fa*) ont aussi des niveaux élevés d'insuline (Coleman, 1978) : cette insuline serait donc incapable de compenser la faible capacité de signalisation de la leptine. On sait aussi que l'intégrité du système de signalisation de la leptine doit être préservé pour que le système nerveux central soit capable de répondre à l'insuline et que cette dernière puisse agir comme facteur de satiété. Cependant, il existe une corrélation entre les niveaux plasmatiques d'insuline et la sensibilité à l'insuline indépendamment de l'adiposité corporelle, ce qui n'est pas le cas pour la leptine (Schwartz *et al.*, 1997). Les niveaux plasmatiques de leptine et d'insuline seraient donc tous deux reliés à la quantité de tissu adipeux corporel, mais par des mécanismes différents (Porte *et al.*, 1998). Plus récemment, Seufert et ses collaborateurs ont démontré l'existence d'effets supprimeurs directs de la leptine sur les cellules beta productrices d'insuline chez l'humain. Ils ont proposé l'existence d'un axe adipoinsulaire par lequel l'insuline stimulerait la production de leptine dans les adipocytes avec une inhibition consécutive, par la leptine, de la production d'insuline dans les cellules beta. Le

dysfonctionnement de cet axe chez les individus obèses, qui se manifeste par une mauvaise réception de la leptine par les cellules beta, peut provoquer une hyperinsulinémie et contribuer à la pathogenèse du diabète (Seufert *et al.*, 1999).

MODE D'ACTION DE LA LEPTINE

Équilibre énergétique

Une grande quantité de littérature chez plusieurs espèces a démontré que les concentrations de leptine circulante sont étroitement reliées à l'adiposité chez les animaux et les humains en équilibre énergétique positif (article de révision, Houseknecht *et al.*, 1998). Étant donné que le jeûne pose un plus grand risque pour la survie de l'individu que la prise excessive d'aliments, la fonction primaire de la leptine ne serait pas de prévenir l'obésité, mais d'orchestrer les adaptations physiologiques face au jeûne (Ahima and Flier, 2000).

Système immunitaire

La littérature récente fait état du rôle de la leptine dans plusieurs aspects de la fonction immunitaire comme l'hématopoïèse, l'immunocompétence et l'inflammation (Gainsford and Alexander, 1999; Houseknecht *et al.*, 1998). En effet, la déficience en leptine due à des anomalies génétiques (*ob/ob* et *db/db*) ou consécutive au jeûne entraîne un mauvais fonctionnement des réponses immunitaires et inflammatoires chez les rongeurs (Fantuzzi and Faggioni, 2000). Ainsi, chez les souris *ob/ob* et les animaux soumis au jeûne, on note, d'une part, une diminution significative de l'activité phagocytaire des macrophages, de la cellularité du thymus, du poids de la rate, de la concentration de lymphocytes et des cellules T induites par les cytokines et, d'autre part, une augmentation de la

mortalité induite par le facteur de nécrose tumorale- α ou par des complexes glucido-lipido-protéiques (LPS) lorsqu'on compare ces animaux à des sujets normaux bien alimentés (Fantuzzi and Faggioni, 2000). Leininger et ses collaborateurs (2000) ont étudié la possibilité d'une augmentation de sensibilité aux maladies causées par le stress dans certains génotypes (très maigre, peu maigre) de porcs avec des réponses immunitaires inappropriées de la part des gènes responsables du métabolisme énergétique, de la prise alimentaire et de la fonction immunitaire comme la leptine. Ils ont trouvé que l'expression de la leptine et le niveau de glucose plasmatique après exposition aiguë à des lipopolysacharides (endotoxémie aiguë) variaient selon le génotype. Ceci les a amenés à proposer que l'expression de la leptine, en tant que réponse à une sollicitation immunitaire, pourrait être utilisée comme marqueur pour la sélection d'un génotype porcin maigre et davantage résistant aux maladies causées par le stress (Leininger *et al.*, 2000).

Angiogenèse

L'angiogenèse est la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir des capillaires en place. Puisque le développement du lit vasculaire dans le tissu adipeux est étroitement relié au nombre et à la taille des adipocytes et comme le tissu adipeux sert de support à la croissance des vaisseaux sanguins, il est concevable que les adipocytes exercent une modulation paracrine sur la nouvelle vascularisation. En raison de ce lien étroit entre l'adipogenèse et l'angiogenèse pendant le développement du gras corporel, Bouloumie et ses collaborateurs (1998) ont voulu vérifier l'hypothèse d'une modulation de la croissance du système vasculaire par la leptine. Ils ont découvert que la leptine produit, par l'intermédiaire des OB-R endothéliaux, un signal de croissance qui déclenche une voie

intracellulaire dépendante de la tyrosine kinase et stimule ainsi des processus angiogéniques. Ils ont spéculé que cette angiogenèse stimulée par la leptine pouvait représenter un événement clé pour l'établissement de l'obésité, mais aussi d'autres conditions physiologiques et pathophysiologiques d'angiogenèse dans d'autres tissus (Bouloumie *et al.*, 1998; Sierra-Honigmann *et al.*, 1998).

Les gènes qui sont régulés par la leptine après l'activation de son récepteur dans l'ovaire sont mal connus. Dans d'autres tissus, on décrivait la régulation par la leptine d'une protéine importante dans le métabolisme et la régulation des stéroïdes : la protéine fixatrice des éléments régulateurs du stérol-1 (SREBP-1; *Sterol Regulatory Element Binding Protein*) connue pour ses effets sur un autre gène, celui de la protéine de régulation rapide de la stéroïdogénèse (StAR, *Steroid Acute Regulatory protein*). Ces gènes sont alors choisis comme candidats et sont étudiés dans ce travail.

PROTÉINES FIXATRICES DES ÉLÉMENTS RÉGULATEURS DU STÉROL-1, SREBP-1

Les gènes ADD-1 et SREBP-1 (homologues chez le rat et l'humain) ont été clonés et caractérisés : ce sont des facteurs de transcription pour la commande de la différenciation des adipocytes (Tontonoz *et al.*, 1993) et pour le contrôle de l'expression génique du cholestérol (Briggs *et al.*, 1993). Toutes les isoformes de SREBP (SREBP-1a, SREBP-1c ou ADD-1, et SREBP-2) sont des précurseurs de protéines de membrane situées dans l'enveloppe nucléaire et le réticulum endoplasmique. En situation de déplétion de stérol, le précurseur est clivé de manière protéolytique, ce qui génère un fragment soluble NH₂-terminal renfermant un domaine d'activation acide et une région hélice-boucle-hélice (bHLH), qui

intervient dans la dimérisation des protéines et la liaison de la SREBP à l'ADN (Brown and Goldstein, 1997). La forme active transloque vers le noyau et active la transcription par l'intermédiaire d'éléments-*cis* qui sont des motifs boîte-E aussi appelés séquences de liaison ADD-1 ou élément régulateur de stéroïdes (SRE) (Kim *et al.*, 1995).

La régulation des niveaux de SREBP-1 se fait par le jeûne et la réalimentation. Elle se ferait par l'intermédiaire de l'insuline ce qui prouve que le SREBP-1 exerce non seulement des effets sur la commande du métabolisme du cholestérol mais aussi sur l'adipogénèse (accumulation de gras et différenciation des adipocytes), effet rehaussé par les PPAR- γ et ses activateurs (Shimomura *et al.*, 2000). En outre, comme nous l'avons mentionné déjà, le SREBP-1 commande l'expression des gènes du métabolisme des acides gras, dont celui du LPL, de l'acétyl coenzyme A de la carboxylase, de la synthase d'acides gras et de la désaturase stéroyl-coA (article de revue par Schoonjans *et al.*, 2000).

PROTÉINE DE RÉGULATION RAPIDE DE LA STÉROÏDOGÈNESE (StAR)

La protéine de régulation rapide de la stéroïdogénèse (StAR), une protéine au rôle essentiel dans la stimulation aiguë de la stéroïdogénèse, a été identifiée récemment dans des cellules de Leydig tumorales chez la souris. La séquence de son ADNc a été décodée chez la souris (Clark *et al.*, 1994), l'humain (Sugawara *et al.*, 1995) et la vache (Hartung *et al.*, 1995). La StAR joue un rôle dans le transport du cholestérol de la membrane mitochondriale externe vers la membrane interne sous l'effet d'agents stimulants de la stéroïdogénèse (Clark *et al.*, 1994). On a proposé qu'elle agirait par la voie de l'AMPc (Clark *et al.*, 1994). Elle est synthétisée sous la forme d'une protéine précurseure cytosolique de 37

kDa, est importée dans la mitochondrie pour enfin donner naissance à 4 isoformes mûres de 30 kDa (Clark *et al.*, 1994; Stocco and Sodeman, 1991). Le transfert du cholestérol vers la membrane interne se déroulerait grâce au précurseur de 37 kDa, forme active de la StAR, et les formes mûres de 30 kDa, bien qu'associées à la membrane mitochondriale interne pendant un temps relativement long, ne seraient plus actives au regard du transport du cholestérol. La séquence d'ADNc et les ARNm de StAR ont été retrouvés et caractérisés chez la souris (Clark *et al.*, 1995), chez l'humain (Sugawara *et al.*, 1995), chez le bovin (Hartung *et al.*, 1995; Pescador *et al.*, 1996) et chez le porc (Pilon *et al.*, 1997).

La livraison du cholestérol à l'enzyme mitochondrial P450 coupeure de la chaîne latérale (P450scc) en réponse à une stimulation hormonale aiguë présuppose une activité de la StAR. Si la conversion du cholestérol en prégnénolone par l'enzyme P450scc constitue une étape limitante de la stéroïdogénèse, le vrai goulot d'étranglement serait le transport du cholestérol vers la membrane mitochondriale interne où est localisée la P450scc.

Le rôle du cholestérol, en particulier des oxystérols, dans certains types de cellules, est de réguler le promoteur de la StAR humaine dépendant du facteur stéroïdogène-1 (SF-1)(Shea-Eaton *et al.*, 2001). Dans des cellules de granulosa et de thèque interne, il se produirait une augmentation des niveaux de la protéine StAR sans aucun changement de l'expression de l'ARN messenger. Ceci possiblement par une régulation positive de la traduction de la protéine ou par une réduction de la dégradation de cette dernière (Christenson *et al.*, 1998). Cependant, dans d'autres études, les chercheurs ont noté que le tissu ovarien de rat traité avec des hormones trophiques présentait des niveaux de cholestérol réduits et par conséquent une augmentation de la forme active du SREBP-1a (Lopez and McLean,

1999). Plus récemment, Shea-Eaton et ses collaborateurs ont constaté que ces deux gènes interagissaient bel et bien et que la régulation du gène de la StAR par les SREBP-1 passait par deux voies, ce qui permet une activation maximale du gène stéroïdogène (Shea-Eaton *et al.*, 2001). Ces deux voies sont : l'interaction avec des cofacteurs de transcription multifonctionnel comme SF-1, le Sp1 et le facteur nucléaire Y (NF-Y) et la liaison directe des SREBP-1 au promoteur StAR sur le site SRE.

Le gène de l'obésité et son récepteur sont étroitement impliqués avec le fonctionnement et l'homéostasie de plusieurs systèmes comme nous l'avons fait remarquer jusqu'ici.

À ce point la révision de la littérature disponible à propos du tissu adipeux comme source primordiale du gène de l'obésité, est nécessaire pour cette étude. Ceci concernant sa structure, son ontogenèse, sa régulation nutritionnelle et hormonale, les facteurs qui y sont sécrétés, spécialement la leptine, en portant appui tout le long de la révision, sur la régulation de la reproduction par ce tissu et par la leptine.

ADIPOSE TISSUE REGULATION OF REPRODUCTION

Tatiana Ruiz-Cortés, Sandra Ledoux and Bruce D. Murphy

Centre de recherche en reproduction animale, Faculté de médecine
vétérinaire Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe,
Québec, Canada, J2S 7C6

Reproduction

The Journal of the Society for Reproduction and Fertility

22 Newmarket Road
Cambridge CB5 8DT, UK
Tel: +44 (0)1223 351809
Fax: +44 (0)1223 359754
reproduction@srf-reproduction-journal.org
www.srf-reproduction.org/journal

19

Dr B Murphy
Faculty of Veterinary Medicine
University of Montreal
3200, rue Sicotte, Saint-Hyacinthe
Quebec J2S 7C6
Canada

12 November 2002

Dear Dr Murphy

Re: U4 Adipose tissue regulation of reproduction

Your manuscript has been reviewed by a member of the Editorial Board and an independent assessor, and their reports are enclosed. Please revise the paper, taking account of the reviewers' comments and any points marked on the manuscript. Figures will be redrawn by our artist and a copy will be sent to you for your approval.

The revised manuscript should be submitted by email or on disk. Please follow the guidelines on the attached form and ensure that the manuscript is in the style and format required. The revised version of the manuscript should be returned to the Editorial Office as soon as possible or by **13/12/02**.

I look forward to receiving the revised version of the manuscript.

Yours sincerely,



Christine Doberska
Managing Editor

RÉSUMÉ

De récentes études ont permis d'identifier le tissu adipeux comme étant un modulateur important de la fonction reproductrice. Ce tissu se développe par différenciation des préadipocytes fibroblastiques et l'adipogenèse est associée à la lipogenèse, soit la formation et la mise en réserve de triglycérides. Le tissu adipeux sécrète plusieurs facteurs qui sont des régulateurs potentiels de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique. Parmi les mieux connus, la leptine, qui assure la régulation de l'appétit et joue un rôle dans le rétrocontrôle de l'adipogenèse. La leptine stimule la sécrétion des gonadotrophines en inhibant les neurones inhibiteurs et en stimulant directement la GnRH et la libération des gonadotrophines. Elle a des effets positifs et négatifs sur les gonades et semble être le signal déclencheur de phénomènes reproducteurs comme la puberté et le cycle oestral. Les effets d'autres facteurs sécrétés par le tissu adipeux sont moins connus. La résistine et l'adiponectine ont des effets opposés, soit respectivement la réduction et l'augmentation de la sensibilité des tissus périphériques à l'insuline. La protéine de stimulation de l'acylation (ASP) assure la régulation du dépôt de gras et provoque l'expression de la leptine tandis que la protéine PPAR- γ reliée à l'angiopoïétine est présente pendant le stress nutritionnel. Nous proposons le modèle suivant : une faible disponibilité d'aliments empêcherait la sécrétion de gonadotrophines et la réponse à cette sécrétion au niveau des gonades et, parallèlement, augmenterait la sensibilité à l'insuline. L'alimentation provoque une augmentation de l'insuline, de la leptine et des gonadotrophines, ce qui se traduit par la reprise de l'activité des gonades, en particulier au chapitre de la folliculogenèse.

ABSTRACT

Recent studies have identified adipose tissue as an important modulator of reproductive function. It develops from the terminal differentiation of fibroblastic pre-adipocytes, and adipogenesis is associated with lipogenesis, the formation and storage of triglycerides. Adipose tissue secretes several factors that are potential modulators of the hypothalamo-hypophyseal-gonadal axis. The best known of these, leptin, regulates appetite and is involved in feedback control of adipogenesis. It stimulates gonadotropin secretion both by inhibition of inhibitory neurons and by direct stimulation of GnRH and gonadotropin release. It has both positive and negative effects on the gonads, and appears to be a permissive signal allowing reproductive events, including puberty and oestrous cycles, to occur. The effects of other adipose-derived factors are less well-defined. Resistin and adiponectin have opposite effects, the former reduces, the latter enhances insulin sensitivity of peripheral tissues. Acylation stimulating protein regulates fat deposition and may bring about leptin expression, while PPAR- γ -angiopoietin-related protein is expressed during times of nutritional stress. A model is proposed by which reduced feed availability prevents gonadotropin secretion and gonadal responses to gonadotropins, meanwhile increasing insulin sensitivity. Feeding causes increases in insulin, leptin and gonadotropins, resulting in renewed gonadal responses, and, in particular, increases in folliculogenesis.

INTRODUCTION

Over the 65 million years of mammalian evolution, the most important factor in the survival of a species has been its capability to reproduce successfully. A panoply of reproductive strategies have survived

the process of evolution. These generally include the birth of young animals to females that are in a nutritive state that is sufficient to meet the energy needs both for the intrauterine development and postnatal survival of the offspring. It has been long recognized in the husbandry and the selection of domestic animals, that nutritional status profoundly influences reproductive function. The best known of the reproductive events modulated by nutrition are the age of puberty, maintenance of ovarian cycles and the return to the reproductive state following parturition.

Intensive investigation of glucose and lipid metabolism and of adipose tissue dynamics in recent years has increased our understanding of the complexities of interactions between feed intake and storage. Adipose tissue has emerged as a key element in nutritional regulation, its principal role is the storage of triglycerides during times of metabolic affluence and their mobilization during periods of nutrient deprivation. Adipose has been shown to be a highly significant endocrine tissue that modulates events including appetite, lipid uptake and metabolism, and even the synthesis of its own constitutive cells. Adipose tissue has also emerged as an important factor in the complex equation by which the nutritional state of a mammal regulates its reproductive function. The purpose of this review is to explore adipose regulation of reproduction in mammals, with emphasis on known and potential mechanisms by which this regulation can be achieved.

STRUCTURE AND ONTOGENY OF ADIPOSE TISSUE

Adipogenesis is the process of terminal differentiation of adipocytes from the stable pool of fibroblastic pre-adipocytes that are found in the connective tissue stroma (MacDougald and Mandrup, 2002). The cells of white adipose tissue are characterized by a single lipid droplet with a relatively low thermogenic potential. This tissue functions largely in

storage of triacylglycerols (Kopecky *et al.*, 2001). The differentiation of white adipose tissue from embryonic fibroblast cells or preadipocytes can be recapitulated in vitro. The biochemical events can be summarized as the activation of long-chain fatty acids to their coenzyme A (CoA) thioesters that are then esterified to phosphatidic acid. This compound is hydrolyzed to diacylglycerol (DAG), which then undergoes a final acylation step to form the storage product, triacylglycerol (Coleman *et al.*, 2000).

The endocrine, paracrine and intracellular control of adipogenesis has been subject to concentrated studies in recent years. The in vitro paradigm provides important clues about the minimum requirements. Treatment of preadipocytes with combination of glucocorticoids and insulin induces their conversion to adipocytes (MacDougald and Mandrup, 2002). Nonetheless these cultures require serum, at least during the early phase of differentiation, suggesting a requirement for growth factors. Indeed, insulin-like growth factor I (IGF-1) and macrophage colony stimulating factor have been shown to be essential to terminal differentiation of adipocytes (MacDougald and Mandrup, 2002). The intracellular signaling pathways of adipogenesis are less well understood, but significant progress has been made in understanding the transcriptional regulation of the genes that promote preadipocyte differentiation. The orphan nuclear receptor, peripheral peroxisome activating receptor- γ (PPAR γ) is a key regulator of the cascade of expression of the genes in the differentiation program, as is the CCAAT/enhancer-binding protein- β (C/EBP- β) (MacDougald and Mandrup, 2002). These two genes, PPAR γ and C/EBP- β , are associated with mitotic arrest and regulate the expression of adipose-specific genes (Ntambi and Young-Cheul, 2000). Another important transcription factor was originally named adipose determination and differentiation-dependent factor 1. It was given its

current name, sterol regulatory element binding protein 1 (SREBP-1), based on its regulatory role in intracellular sterol homeostasis in most cell types. (Brown and Goldstein, 1997). This notwithstanding, SREBP-1 regulates the enzymes in adipose tissue that synthesize triglycerides, including fatty acid synthase (Gondret *et al.*, 2001).

NUTRITIONAL AND HORMONAL REGULATION OF ADIPOSE TISSUE

It is axiomatic that the quantity of adipose tissue is ultimately regulated by the balance between nutrient intake and catabolism by the organism. Acute experiments have shown that, as expected, fasting reduces lipogenesis, increases lipolysis, and results in a net loss of adipose tissue (Kersten, 2001). Realimentation with diets high in carbohydrates causes rapid increases in triacylglycerol concentrations in adipose tissue (Sul *et al.*, 2000). These changes can be attributed, at least in part, to changes in expression of fatty acid synthase, mediated by SREBP (Latasa *et al.*, 2000). Feeding of diets containing triglycerides and saturated fatty acids to animals increases adipogenesis (Perona *et al.*, 2000; Portillo *et al.*, 2001). Unsaturated fatty acids can stimulate or inhibit lipogenesis, depending on variant dietary conditions and combinations. They clearly induce preadipocyte differentiation, apparently acting as ligands for PPAR γ (MacDougald and Mandrup, 2002).

The hormonal program that regulates adipose tissue and lipogenesis is complex, and a detailed discussion is beyond the scope of this review. Briefly, the most important circulating hormones that alter fat deposition are insulin and growth hormone, working at counter-purposes. Insulin secretion is induced by dietary carbohydrates, thus providing a mechanism for carbohydrate-induced lipogenesis. Insulin effects on expression of lipogenic genes are long term and profound (Assimacopoulos-Jeannet *et*

al., 1995). Growth hormone decreases lipid synthesis and compromises many of the effects of insulin, particularly the stimulation of fatty acid synthase (Etherton, 2001). The obese phenotype observed in mice bearing null mutations of the aromatase gene (ArKO) resulting in reduced estrogen synthesis (Jones *et al.*, 2001,) or activity (Mueller and Korach, 2001) demonstrates the importance of these hormones in regulation of adipose. Other hormone of importance, leptin, discussed in more detail below, is a peptide hormone produced by adipose tissue that may limit lipogenesis directly (Kersten, 2001). Adipose tissue synthesizes a further regulator of lipogenesis, acylation stimulating protein (ASP), a small peptide that modulates the rate at which fatty acids are taken up and converted to triglycerides in fat cells (Cianflone *et al.*, 1999). ASP functions as an autocrine regulator of fat accumulation (Cianflone *et al.*, 1999). Inhibitory regulation of adipogenesis is achieved by cytokines including tumor necrosis factor- α (TNF- α) and an array of interleukins, including IL-1, IL-6, and IL-11 (MacDougald and Mandrup, 2002).

ENDOCRINE FACTORS SECRETED BY ADIPOSE TISSUE

Adipose tissue has gained the status of endocrine organ because of factors it secretes that are carried in circulation, and invoke effects in extra-adipose tissues. The recognition of adipose as an endocrine tissue has spurred investigation and discovery of factors produced by fat cells that may have wide ranging effects on metabolic processes. Molecular analysis of adipogenesis has been a fruitful approach to determination of the intracellular events and their regulation. The best known of the adipose-derived factors is the 16 kDa protein, leptin, discovered by Freedman and colleagues. (Zhang *et al.*, 1994). Leptin signals the presence of adequate energy reserves. It is acutely regulated by feed intake, and may preserve

reproductive function during metabolic stress (Ahima *et al.*, 1996). It links adipose tissue to both the neuroendocrine and peripheral control of reproductive events. Adipose tissue secretes cytokines and other molecules that have effects on peripheral metabolism and reproduction. Table Ia is an annotated list of known adipose secretory proteins. Those that have known or potential effects on reproduction are discussed in greater detail.

Leptin

The importance of leptin in reproduction is highlighted by the fact that obese mice bearing a spontaneous mutation preventing leptin synthesis are anovulatory (Zhang *et al.*, 1994). Administration of recombinant leptin renders them fertile (Mounzih *et al.*, 1997). The mechanisms of this effect have been the subject of intensive investigation in several species, and a consensus has emerged that leptin acts on the neuroendocrine system that regulates gonadotropin secretion. It is well known that nutritional restriction and reduction in body fat reduce the frequency and magnitude of the secretion of GnRH and, consequently, the frequency of gonadotropin pulses. The earliest studies showed that peripheral luteinizing hormone (LH) concentrations are increased by treatment of mice that are genetically deficient in leptin with a recombinant version of the hormone (Barash *et al.*, 1996). Intracerebroventricular (ICV) (Amstalden *et al.*, 2002; Henry *et al.*, 2001) and peripheral (Jackson *et al.*, 2002) infusion of leptin increase the frequency of gonadotropin secretory pulses. In vitro studies with hypothalamic explants demonstrate that leptin can provoke the secretion of GnRH (Woller *et al.*, 2001) suggesting that the hypothalamus is an important site of action.

Effects of leptin on the hypothalamo-hypophyseal component of the reproductive axis.

Figure 2 depicts the mechanisms of leptin action in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis. The fully functional (long) form of the leptin receptor is widely expressed in the hypothalamus, including the ventromedial, arcuate, paraventricular and supraoptic nuclei, along with the median eminence, and lateral hypothalamic regions (Dyer *et al.*, 1997; Hubschle *et al.*, 2001; Iqbal *et al.*, 2000). Leptin receptors colocalize on neurons with neurotransmitters known to have an effect on GnRH secretion, including neuropeptide Y (NPY; Jequier, 2002). NPY has contrasting effects on gonadotropin secretion, depending on the physiological state of the animal. In intact animals, ICV infusion induces GnRH release, while in ovariectomized animals, NPY inhibits GnRH expression (Sainsbury *et al.*, 2002). In the ovariectomized mice however, the GnRH levels are also affected by the deleted estradiol positive feedback, contributing indirectly to the decreased GnRH expression.

As the leptin concern, it appears to have a single effect on NPY neurons in the hypothalamus, reduction of NPY expression (Jequier, 2002). How then might the effects of leptin be mediated through NPY? The explanation may be in NPY receptors. There are at least five NPY receptor subtypes expressed in the hypothalamus, (Y1, Y2, Y4, Y5 and Y6) and while these share ligand specificity, their primary amino acid sequences are poorly conserved (cited in Sainsbury *et al.*, 2002). Studies of mice with targeted mutations in specific isoforms indicate that neurons bearing the Y1 and Y4 isoforms, transduce the inhibitory effects of NPY. Treatment of mice lacking the Y1 isoform of the receptor with leptin increases gonadotropin secretion and occasions earlier puberty in response to leptin treatment (Pralong *et al.*, 2002). Likewise, crossing of mice bearing a NPY Y-4 receptor null mutation with infertile ob/ob (leptin deficient) mice restores fertility (Sainsbury *et al.*, 2002). These results indicate that negative

effects of leptin seemed to be related mainly with NPY receptors subtypes Y1 and Y4. For the Y2, Y5 and Y6 receptors more studies need to be done.

The negative modulation of leptin action on GnRH may also be mediated by orexins, 33 aa peptides that inhibit GnRH secretion in the hypothalamus (Russell *et al.*, 2001). To date, a clear connection between leptin and orexin expression has not been established.

Galanin and galanin like peptide (GALP) are candidate neurotransmitters to mediate the positive effects of leptin on the hypothalamus. These are relatively small peptides (29 and 60 aa respectively) that interact with multiple galanin receptors (Gundlach, 2002). The long form of the leptin receptor colocalizes with the expression of galanin in the paraventricular, supraoptic and arcuate nuclei of the hypothalamus (Iqbal *et al.*, 2001). GALP-leptin colocalization appears restricted to the central region of the arcuate nucleus (Cunningham *et al.*, 2002). Galanin induces release of GnRH, and inputs to GnRH secreting neurons from those expressing galanin have been documented in a number of species (Gundlach, 2002). GALP is emerging as an important positive intermediate in leptin regulation of GnRH secretion. Its expression is reduced by fasting, and this effect can be reversed by leptin treatment, and ICV GALP infusion provokes GnRH and LH secretion (Clifton *et al.*, 2002). Another potential neurotransmitter that may serve to intermediate leptin-induced GnRH secretion is the cocaine and amphetamine-regulated transcript (CART) which has been shown to be highly expressed in the median eminence. In support of this contention, treatment with CART antibody was shown to attenuate leptin stimulation on GnRH pulsatility. This suggests that CART as well as NPY may play an important role mediating leptin control of reproduction. The downstream mediators of

CART, its receptors and the mechanism whereby it regulates GnRH release requires further investigation (Brann *et al.*, 2002).

Leptin regulation of GnRH may also be achieved by its direct effects on GnRH secreting neurons. While there appears to be no direct in situ evidence for this view, leptin has a clear stimulatory effect when perfused into dispersed hypothalamic neurons (Woller *et al.*, 2001) and in static cultures of immortalized GnRH secretory cells (Magni *et al.*, 1999). Further, low doses of leptin cause release of LH and follicle stimulating hormone (FSH) in vitro (De Biasi *et al.*, 2001; Ogura *et al.*, 2001).

Effects of leptin on the gonads

There is evidence for direct effects of leptin on the ovary and the testis in a variety of species. Indeed, leptin receptors are expressed in the ovary in luteal, granulosa and theca cells, in the oocyte (e.g. Ruiz-Cortés *et al.*, 2000), and in the testis in Leydig and in Sertoli cells (Tena-Sempere, 2002). Given the positive effects on gonadotropin secretion and fertility, leptin would be expected to have either a positive local effect, or no effect at all. Some investigators suggest that the direct effects of leptin on ovarian cells are inhibitory, attributable to attenuation of gonadotropin, insulin, insulin-like growth factor-1 (IGF-I) and/or glucocorticoid mediated steroidogenesis (Spicer, 2001). Similarly, doses of leptin decrease the hCG stimulated expression levels of steroidogenic factor 1 (SF1), steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and cytochrome P450 side-chain cleavage (P450_{scc}) mRNAs in the rodent testis (Tena-Sempere *et al.*, 2001).

Contrasting studies have demonstrated direct stimulatory effects of leptin in the ovary. Leptin in concentrations similar to those found in circulation stimulate progesterone synthesis in pig granulosa cells, while high doses are inhibitory (Ruiz-Cortés *et al.*, 2002). The same biphasic effect was reported for the regulation of the steroid regulatory binding protein-1

(SREBP-1) and the promoter of the steroid acute regulatory gene (StAR, Ruiz-Cortés *et al.*, 2002). Other positive effects of leptin include induction of cytochrome P450 aromatase activity and consequent estrogen synthesis in ovarian follicles. The resolution of these conflicting data may lie in comparison of models. In static culture systems of hypothalamic, pituitary, ovarian and Leydig cells, pharmacological doses of leptin (i.e. concentrations one or more orders of magnitude in excess of circulating levels) have no effect or are frank inhibitors of cellular responses. In the pulsatile administration of isolated neurons by perifusion, higher doses of leptin had a clear stimulatory effect (Woller *et al.*, 2001) suggesting that prolonged exposure to high doses is the inhibitory element in the equation. We therefore speculate that leptin at physiological levels has positive effects on all three components of the reproductive axis, the hypothalamus, the hypophysis and the gonads.

Is leptin a primary or a permissive signal for reproductive events?

In the leptin-deficient mouse both male and female fertility can be restored by leptin administration (Mounzih *et al.*, 1997). This strongly argues for a leptin requirement for successful reproduction. The capacity of leptin to directly induce gonadotropin release suggests that it may be a primary inducer of the reproductive state. Attainment of puberty provides a test case for the causal versus permissive role of leptin. Prior to puberty, leptin expression increases with body fat, and these increases correlate with attainment of puberty in rodents (Ahima *et al.*, 1997). Developmental profiles of circulating leptin and leptin mRNA abundance in adipose tissue over the four months preceding puberty in female calves demonstrate linear correlation with body weight, and a peak prior to puberty (Williams *et al.*, 2002). Administration of leptin to immature female mice hastens the onset of puberty (Ahima *et al.*, 1997). Nonetheless, recent studies of

administration of leptin to ram lambs demonstrated no effect on gonadotropin secretion in the absence of a detectable pattern of pulsatile LH release (Jackson *et al.*, 2002). Postpubertal patterns of gonadotropin release were induced by leptin in animals that had acquired the capacity for episodic secretion. Together, these results argue for a permissive role of leptin, perhaps functioning in attenuation of inhibitory influences on hypothalamic gonadotropin secretion. The effects of leptin on recrudescence of testicular or ovarian function following seasonal inactivity have been little studied. A single report indicates that infusion of leptin has no effect on reproductive cycles on testicular function in hamsters that are reproductively incompetent due to short photoperiod (Atcha *et al.*, 2000), suggesting that it does not have a primary role in recrudescence. The return to ovarian cyclicity following parturition provides another potential example, but the issues are complicated by elevated metabolic requirements associated with lactation, consequent negative energy balance and suckling stimulus, all of which impair gonadotropin secretion (Smith and Grove, 2002). It is known that leptin declines following parturition, and concurrent declines in hypothalamic leptin receptors may also occur (Smith and Grove, 2002). Definitive studies of leptin administration are not available, thus causal versus permissive effects on postpartum cyclicity have not been established.

Resistin

Resistin is an adipose-specific polypeptide of 114 amino acids that circulates as a homodimer, connected by a disulfide bond (Steppan *et al.*, 2001a). Mining of the National Center for Biotechnology Information BLAST server, DNASTAR (DNASTar, Madison, WI), PSORT, and SIGNALP algorithms revealed at least two closely related proteins, one of which is expressed in adipose tissue (Steppan *et al.*, 2001b). Resistin

increases in obesity and is believed to intensify resistance to insulin in peripheral tissues. Its expression is upregulated by insulin (Kim *et al.*, 2001), thus it may be a mechanism by which insulin modifies its own activity. It is of interest that resistin gene expression is modulated by androgens (Ling *et al.*, 2001). Modification of tissue sensitivity to insulin could have wide ranging consequences, as insulin has positive if pleiotropic effects on reproduction. For example, infusion of insulin into the third ventricle of the ram increases LH pulse frequency (Blache *et al.*, 2000) and it is well known that insulin interacts with gonadotropins to increase steroidogenesis via increases in substrate uptake by steroidogenic cells (Murphy and Silavin, 1989). Insulin synergizes with gonadotropins to increase steroid synthesis in granulosa cells under serum-free conditions (Greisen *et al.*, 2001), indicating effects other than importation of external cholesterol. Indeed, there is evidence for insulin induction of expression of StAR and steroidogenic enzymes in ovarian cells (Sekar *et al.*, 2000). Although resistin is an interesting candidate for adipose regulation of reproduction, no peripheral tissue receptor has yet been identified, and its role at the level of the hypothalamus, pituitary and gonads has not been clarified. Further, recent studies suggest that preadipocytes, rather than mature fat cells are the major source of the polypeptide (Kim *et al.*, 2001).

Adiponectin

Adiponectin was independently identified by four research groups, and thus goes by a series of names including Acrp30, AdipoQ, GBP28 and apM1 (Havel, 2000). It is a 30 kD protein that has a collagen domain, a globular domain, and a crystal structure that resembles members of the tumour necrosis factor family (Havel, 2000). It circulates as a homotrimer, and its receptor has not yet been identified (Havel, 2000). Its concentration in circulation correlates negatively with adipose mass, in contrast to leptin.

Further, women display higher circulating levels than men, and weight loss in both is characterized by increases in adiponectin in plasma (Berg *et al.*, 2002). Circulating concentrations of leptin display diurnal pulses and postprandial elevations, while adiponectin does not undergo significant diurnal variation (Yang *et al.*, 2001), suggesting that it is not acutely regulated. The biological effect of adiponectin is to increase the sensitivity of peripheral tissues to insulin (Yamauchi *et al.*, 2001). Injection of adiponectin alone to diabetic mice transiently reduces blood glucose and suppresses glucose production (Berg *et al.*, 2001). Adiponectin appears to synergize with leptin in reversing insulin resistance in mice (Yamauchi *et al.*, 2001). Adiponectin knockout mice have been generated and the homozygote animals are fertile, indicating that adiponectin is not essential for reproduction (Ma *et al.*, 2002). Nonetheless, given the importance of insulin to gonadotrophin secretion and steroidogenesis, adiponectin has high potential as an adipose tissue modulator of reproductive function.

Acylation stimulating protein (ASP) and adipsin

As noted above, acylation stimulating protein is a basic serum protein that has the capacity to stimulate triglyceride synthesis in adipocytes (Cianflone *et al.*, 1999). It is identical to C3adesArg, the inactive fragment of the complement peptide, C3a (Cianflone *et al.*, 1999). Cleavage of ASP from the parent molecule is achieved by adipsin, a serine protease, homologous to complement factor D, but highly expressed in adipose tissue (White *et al.*, 1992). It is believed that ASP interacts with a specific receptor in adipose tissue, i.e. a receptor that differs from the complement C3 receptor. Intense investigation is underway to establish its identity. ASP has been shown to increase glucose uptake in a muscle cell line (Tao *et al.*, 1997). The null mutation of C3, and thus ASP in mice, reduced body fat, feed efficiency, and leptin concentrations (Murray *et al.*,

2000), but there appears to be no disruption in reproductive processes, as homozygote null mutation mice display fertility not different from the wild type. Nonetheless, ASP expression is regulated by estrogen, and may be in the cascade of events that modulate nutritional responses to reproduction. Given its effects on adipose accumulation it may be an important regulator of the synthesis of leptin.

**Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ)
- angiopoietin related factor (PGAR) or fasting induced adipose factor (FIAF)**

A newly discovered secreted protein of 45 kDa emerged from studies employing subtractive hybridization of adipose tissue that was stimulated by PPAR γ ligands (Dyer *et al.*, 1997; Kersten *et al.*, 2000). This protein has been found in both humans and mice and is expressed predominantly in adipose tissue, both brown and white, and at minor levels in lung, liver and kidney of mice (Kersten *et al.*, 2000). It is strongly expressed in the human placenta (Yoon *et al.*, 2000). Structurally, it has a fibrogen-like domain and is a member of the angiopoietin family (Yoon *et al.*, 2000). As its name would imply, it is induced by PPAR γ and by fasting (Yoon *et al.*, 2000), and is strongly expressed in adipocytes during differentiation (Kersten *et al.*, 2000). Its upregulation during times of nutritional stress and its expression in the placenta point to potential roles in nutritional regulation of reproduction, but the target tissues and receptor mechanisms remain obscure.

**MODELS FOR ADIPOSE TISSUE MODULATION OF
REPRODUCTIVE FUNCTION**

The spectrum of metabolic affluence in mammals runs from severe malnutrition to obesity. The latter condition is common in humans and among species under direct human control, including pet and laboratory animals. More common conditions, both in domestic and wild species, are short-term malnutrition (fasting) and seasonal deficiency in dietary energy. Both of these conditions occur in domestic species under current animal husbandry systems, generally with measurable effects on reproductive events, including attainment of puberty, return to breeding condition after seasonal anestrus, and reinitiation of reproductive cycles after parturition. In the latter case, malnutrition can be exacerbated by lactational demands. Indeed, there is a wealth of literature to demonstrate the relative adiposity or “body condition score” is an important predictor of first postpartum estrus in cattle (Roche *et al.*, 2000). Realimentation after short term nutrient deprivation or “flushing” is well known to increase ovulation rates in litter bearing species (e.g. pigs, Cosgrove *et al.*, 1992). The question addressed in this review is how adipose tissue and the factors it secretes contribute to the well-known phenomenon of nutritional modulation of reproductive function.

Short term nutrient deprivation affects reproduction in mammals (Figure 4A). There is consistent evidence for fasting-induced reduction in gonadotropin secretion in pigs (e.g. Mao *et al.*, 1999), sheep (Nagatani *et al.*, 2000) and cattle (Amstalden *et al.*, 2000). Fasting also alters ovarian function, including reduction in LH receptor populations and granulosa cell estrogen synthesis (Spicer *et al.*, 1992). Insulin is an important player in diet-induced metabolic changes, and insulin reduction is a factor in reduced pituitary and gonadal responses. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) has also been shown to play an essential role (Spicer *et al.*, 1992). Reproductive responses to short term feed deprivation are also due to direct

effects of factors synthesized in adipose tissue. Lipolysis occurs in human adipose tissue even during short overnight fasting (Coppack *et al.*, 2001) and during feed restriction in pigs (Neubert *et al.*, 1999). As should be expected, short-term deprivation or restriction in energy intake causes decreases in circulating leptin in most species studied, for example in cattle (Amstalden *et al.*, 2000) and sheep (Nagatani *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2002). Given the positive effects of leptin on gonadotropin secretion, leptin deficiency may well be responsible for many of the short-term changes in the reproductive axis. Resistin expression, the other hand, is reduced by fasting in rats (Kim *et al.*, 2001), and thus, increased insulin resistance is not expected to play a role in fasting-induced reproductive function. Adiponectin increases with lipolysis, and its peripheral effect is to increase insulin sensitivity. While it may partially ameliorate the effects of fasting, it may not play a role in fasting-induced effects on reproduction. ASP, on the other hand, decreases with fasting, and had been shown to be involved in fatty acid and glucose uptake by tissues (Maslowska *et al.*, 1997; Tao *et al.*, 1997). Whether modulation of ASP affects gonadotropin secretion or ovarian function remains to be determined. PGAR can be found in circulation and is induced by fasting (Kersten *et al.*, 2000). As with other factors, whether it plays a role in ovary is unknown.

Longer term restriction of dietary energy levels or malnutrition is known to profoundly reduce gonadotropin secretion and ovarian function in pigs (Prunier and Quesnel, 2000), sheep (Gonzalez *et al.*, 1987) and cattle (Wiltbank *et al.*, 2002). Thirty day restriction of dietary energy decreased both insulin and IGF-1 in circulation in the cow (Armstrong *et al.*, 2001). These changes are accompanied by direct effects on the steroidogenic capability of the ovary, apparently independent of gonadotropin secretion in cattle (Gutierrez *et al.*, 1997). Absence or reduction of leptin may be

responsible for these effects. The role of ASP, as during short-term energy deprivation, may be to regulate peripheral tissue uptake of nutrients. Factors that increase during food deprivation and lipolysis, including PGAR and adiponectin remain unknown as modulators of reduced reproductive function.

Flushing, the refeeding of animals after short or long term food deprivation, can result in an increase in ovulation rate more rapidly than should be expected based solely on the mass of adipose tissue (Figure 4B). There is correlation between refeeding and leptin pulse frequency (Barb *et al.*, 2001b), and between leptin concentrations in circulation and leptin in cerebrospinal fluid (Ingvarsen and Boisclair, 2001). The response is rapid: increases in expression of leptin by adipose tissue have been observed within 4 h after initiation of refeeding in fasted rats (Saladin *et al.*, 1995). Leptin infusion increases gonadotropin secretion in pigs (Barb, 1999) and sheep (Smith *et al.*, 2002) as well as mice and rats (Brann *et al.*, 2002), suggesting that leptin modulates the effects of flushing. Adiponectin may also play a key role in the response to refeeding, as it is negatively correlated with body fat, reduced during short-term deprivation, and increases the sensitivity of peripheral tissues to insulin. In cattle, estrogen synthesis in response to FSH is greater in granulosa cells from animals given short-term increases in dietary intake (Armstrong *et al.*, 2002). It is well known that the effects of gonadotropins on the ovary are enhanced by insulin, thus providing a credible mechanism to explain refeeding induced increases in ovarian folliculogenesis. As noted above, adiponectin may act in synergy with leptin, thus the total flushing effect may be the result of this combination of increased gonadotropin secretion and increased peripheral response to gonadotropins. The role of other adipose derived factors in the flushing response is not currently known. PGAR levels increase

dramatically during fasting, an effect that is reversed by refeeding or by leptin treatment (Yoon *et al.*, 2000). As the peripheral effects of PGAR are currently unknown, its role in the reproductive responses to refeeding remain unclear. Likewise, resistin mRNA levels are very low during fasting and increase 25-fold when fasted mice were refed a high carbohydrate diet, while insulin expression increases at a similar level of magnitude (Kim *et al.*, 2001). Increased insulin resistance is not expected to be compatible with increased follicular development, for reasons discussed above. Thus, as with PGAR and ASP, the role of resistin in flushing remains to be discovered.

Figure 4 provides a model for regulation of reproduction by adipose-derived factors during periods of short or long-term nutrient deprivation. Under these conditions, insulin levels decline, with a consequent reduction or elimination of adipogenesis. Adipose derived factors, particularly leptin undergo a concurrent decline. Adiponectin is elevated, and this may increase peripheral sensitivity to reduced insulin concentrations. The absence of adipose derived stimulatory factors results in reduced frequency of GnRH stimulated gonadotropin pulses, reducing ovarian activity. Refeeding causes rapid increases in insulin secretion, which may act on the ovarian and neural cells rendered hypersensitive by adiponectin. In addition, leptin levels increase, thereby provoking increases in gonadotropin secretion. The consequence is induction of increased follicular development, culminating in ovulation of a greater number of oocytes in litter bearing species. The evidence remains somewhat fragmentary, but our understanding of the important role of adipose tissue as an endocrine regulator of reproduction is increasing rapidly.

REFERENCES

- Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E and Flier JS** (1996) Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting *Nature* **382** 250-2
- Ahima RS, Dushay J, Flier SN, Prabakaran D and Flier JS** (1997) Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice *Journal of Clinical Investigation* **99** 391-5
- Amstalden M, Garcia MR, Williams SW, Stanko RL, Nizielski SE, Morrison CD, Keisler DH and Williams GL** (2000) Leptin gene expression, circulating leptin, and luteinizing hormone pulsatility are acutely responsive to short-term fasting in prepubertal heifers: relationships to circulating insulin and insulin-like growth factor I(1) *Biology of Reproduction* **63** 127-33
- Amstalden M, Garcia MR, Stanko RL, Nizielski SE, Morrison CD, Keisler DH and Williams GL** (2002) Central infusion of recombinant ovine leptin normalizes plasma insulin and stimulates a novel hypersecretion of luteinizing hormone after short-term fasting in mature beef cows *Biology of Reproduction* **66** 1555-61
- Armstrong DG, McEvoy TG, Baxter G, Robinson JJ, Hogg CO, Woad KJ, Webb R and Sinclair KD** (2001) Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: associations with the ovarian insulin-like growth factor system *Biology of Reproduction* **64** 1624-32
- Armstrong DG, Gong JG, Gardner JO, Baxter G, Hogg CO and Webb R** (2002) Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short-term changes in dietary intake *Reproduction* **123** 371-8
- Assimacopoulos-Jeannet F, Brichard S, Rencurel F, Cusin I and Jeanrenaud B** (1995) In vivo effects of hyperinsulinemia on lipogenic

enzymes and glucose transporter expression in rat liver and adipose tissues
Metabolism **44** 228-33

Atcha Z, Cagampang FR, Stirland JA, Morris ID, Brooks AN, Ebling FJ, Klingenspor M and Loudon AS (2000) Leptin acts on metabolism in a photoperiod-dependent manner, but has no effect on reproductive function in the seasonally breeding Siberian hamster (*Phodopus sungorus*)
Endocrinology **141** 4128-35

Barash IA, Cheung CC, Weigle DS, Ren H, Kabigting EB, Kuijper JL, Clifton DK and Steiner RA (1996) Leptin is a metabolic signal to the reproductive system
Endocrinology **137** 3144-7

Barb CR (1999) The brain-pituitary-adipocyte axis: role of leptin in modulating neuroendocrine function
Journal of Animal Science **77** 1249-57

Barb CR, Barrett JB, Kraeling RR and Rampacek GB (2001) Serum leptin concentrations, luteinizing hormone and growth hormone secretion during feed and metabolic fuel restriction in the prepuberal gilt
Domestic Animal Endocrinology **20** 47-63

Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M and Scherer PE (2001) The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action
Nat Med **7** 947-53

Berg AH, Combs TP and Scherer PE (2002) ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism
Trends Endocrinology Metab **13** 84-9

Blache D, Chagas LM, Blackberry MA, Vercoe PE and Martin GB (2000) Metabolic factors affecting the reproductive axis in male sheep
Journal of Reproduction and Fertility **120** 1-11

Brann DW, Wade MF, Dhandapani KM, Mahesh VB and Buchanan CD (2002) Leptin and reproduction
Steroids **67** 95-104

Brown MS and Goldstein JL (1997) The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor *Cell* **89** 331-40

Cianflone K, Maslowska M and Sniderman AD (1999) Acylation stimulating protein (ASP), an adipocyte autocrine: new directions *Semin Cell Dev Biol* **10** 31-41

Cianflone KM, Sniderman AD, Walsh MJ, Vu HT, Gagnon J and Rodriguez MA (1989) Purification and characterization of acylation stimulating protein *Journal of Biological Chemistry* **264** 426-30

Clifton DK, Jureus A, Cunningham MJ, Krasnow SM, McLain M, Scarlett JM, Teklemichael D, Li D, Leilibadi S, Acohido B, Fraley GS and Steiner RA (2002) Galanin-like peptide: a potential mediator of leptin's effects on reproduction *Biology of Reproduction* **66**(Suppl.1) 90

Coleman RA, Lewin TM and Muoio DM (2000) Physiological and nutritional regulation of enzymes of triacylglycerol synthesis *Annu Rev Nutr* **20** 77-103

Coppack SW, Patel JN and Lawrence VJ (2001) Nutritional regulation of lipid metabolism in human adipose tissue *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* **109** S202-S214

Cosgrove JR, Tilton JE, Hunter MG and Foxcroft GR (1992) Gonadotropin-independent mechanisms participate in ovarian responses to realimentation in feed-restricted prepubertal gilts *Biology of Reproduction* **47** 736-45

Cunningham MJ, Scarlett JM and Steiner RA (2002) Cloning and distribution of galanin-like peptide mRNA in the hypothalamus and pituitary of the macaque *Endocrinology* **143** 755-63

De Biasi SN, Apfelbaum LI and Apfelbaum ME (2001) In vitro effect of leptin on LH release by anterior pituitary glands from female rats at the

time of spontaneous and steroid-induced LH surge *European Journal of Endocrinology* **145** 659-65

Dyer CJ, Simmons JM, Matteri RL and Keisler DH (1997) cDNA cloning and tissue-specific gene expression of ovine leptin, NPY-Y1 receptor, and NPY-Y2 receptor *Domestic Animal Endocrinology* **14** 295-303

Etherton TD (2001) Porcine growth hormone: a central metabolic hormone involved in the regulation of adipose tissue growth *Nutrition* **17** 789-92

Gondret F, Ferre P and Dugail I (2001) ADD-1/SREBP-1 is a major determinant of tissue differential lipogenic capacity in mammalian and avian species *J Lipid Res* **42** 106-13

Gonzalez A, Murphy BD, de Alba J and Manns JG (1987) Endocrinology of the postpartum period in the Pelibuey ewe *Journal of Animal Science* **64** 1717-24

Greisen S, Ledet T and Ovesen P (2001) Effects of androstenedione, insulin and luteinizing hormone on steroidogenesis in human granulosa luteal cells *Human Reproduction* **16** 2061-5

Gundlach AL (2002) Galanin/GALP and galanin receptors: role in central control of feeding, body weight/obesity and reproduction? *European Journal of Pharmacology* **440** 255-68

Gutierrez CG, Oldham J, Bramley TA, Gong JG, Campbell BK and Webb R (1997) The recruitment of ovarian follicles is enhanced by increased dietary intake in heifers *Journal of Animal Science* **75** 1876-84

Havel PJ (2000) Role of adipose tissue in body-weight regulation: mechanisms regulating leptin production and energy balance. *Proceedings of the Nutrition Society* **59** 359-371

Henry BA, Goding JW, Tilbrook AJ, Dunshea FR and Clarke IJ

(2001) Intracerebroventricular infusion of leptin elevates the secretion of luteinising hormone without affecting food intake in long-term food-restricted sheep, but increases growth hormone irrespective of bodyweight *Journal of Endocrinology* **168** 67-77

Hubschle T, Thom E, Watson A, Roth J, Klaus S and Meyerhof W

(2001) Leptin-induced nuclear translocation of STAT3 immunoreactivity in hypothalamic nuclei involved in body weight regulation *Journal of Neuroscience* **21** 2413-24

Ingvartsen KL and Boisclair YR (2001) Leptin and the regulation of food intake, energy homeostasis and immunity with special focus on periparturient ruminants *Domestic Animal Endocrinology* **21** 215-50

Iqbal J, Pompolo S, Considine RV and Clarke IJ (2000) Localization of leptin receptor-like immunoreactivity in the corticotropes, somatotropes, and gonadotropes in the ovine anterior pituitary *Endocrinology* **141** 1515-20

Iqbal J, Pompolo S, Murakami T, Grouzmann E, Sakurai T, Meister B and Clarke IJ (2001) Immunohistochemical characterization of localization of long-form leptin receptor (OB-Rb) in neurochemically defined cells in the ovine hypothalamus *Brain Research* **920** 55-64

Jackson LM, Nagatani S, Jaffe CA and Foster DL (2002) Leptin as a metabolic signal regulation gonadotropin-releasing hormone secretion: insights from sheep models *Biology of Reproduction* **66** (Suppl 1) 89

Jequier E (2002) Leptin signaling, adiposity, and energy balance *Annals of the New York Academy of Science* **967** 379-88

Jones ME, Thorburn AW, Britt KL, Hewitt KN, Misso ML, Wreford NG, Proietto J, Oz OK, Leury BJ, Robertson KM, Yao S and Simpson

ER (2001) Aromatase-deficient (ArKO) mice accumulate excess adipose tissue *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **79** 3-9

Kersten S, Mandard S, Tan NS, Escher P, Metzger D, Chambon P, Gonzalez FJ, Desvergne B and Wahli W (2000) Characterization of the fasting-induced adipose factor FIAF, a novel peroxisome proliferator-activated receptor target gene *Journal of Biological Chemistry* **275** 28488-93

Kersten S (2001) Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis *EMBO Reports* **2** 282-6

Kim KH, Lee K, Moon YS and Sul HS (2001) A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation *Journal of Biological Chemistry* **276** 11252-6

Kopecky J, Rossmeisl M, Flachs P, Bardova K and Brauner P (2001) Mitochondrial uncoupling and lipid metabolism in adipocytes *Biochem Soc Trans* **29** 791-7

Latasa MJ, Moon YS, Kim KH and Sul HS (2000) Nutritional regulation of the fatty acid synthase promoter in vivo: sterol regulatory element binding protein functions through an upstream region containing a sterol regulatory element *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **97** 10619-24

Ling C, Kindblom J, Wennbo H and Billig H (2001) Increased resistin expression in the adipose tissue of male prolactin transgenic mice and in male mice with elevated androgen levels *FEBS Letters* **507** 147-50

Ma K, Cabrero A, Saha PK, Kojima H, Li L, Chang BH, Paul A and Chan L (2002) Increased beta -oxidation but no insulin resistance or glucose intolerance in mice lacking adiponectin *Journal of Biological Chemistry*

MacDougald OA and Mandrup S (2002) Adipogenesis: forces that tip the scales *Trends in Endocrinology and Metabolism* **13** 5-11

Magni P, Vettor R, Pagano C, Calcagno A, Beretta E, Messi E, Zanisi M, Martini L and Motta M (1999) Expression of a leptin receptor in immortalized gonadotropin-releasing hormone-secreting neurons *Endocrinology* **140** 1581-5

Mao J, Zak LJ, Cosgrove JR, Shostak S and Foxcroft GR (1999) Reproductive, metabolic, and endocrine responses to feed restriction and GnRH treatment in primiparous, lactating sows *Journal of Animal Science* **77** 724-35

Maslowska M, Sniderman AD, Germinario R and Cianflone K (1997) ASP stimulates glucose transport in cultured human adipocytes *International Journal of Obesity Related Metabolic Disorders* **21** 261-6

Mounzih K, Lu R and Chehab FF (1997) Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males *Endocrinology* **138** 1190-3

Mueller SO and Korach KS (2001) Estrogen receptors and endocrine diseases: lessons from estrogen receptor knockout mice *Current Opinion in Pharmacology* **1** 613-9

Murphy BD and Silavin SL (1989) Luteotrophic agents and steroid substrate utilization *Oxford Reviews of Reproductive Biology* **11** 179-223

Murray I, Sniderman AD, Havel PJ and Cianflone K (1999) Acylation stimulating protein (ASP) deficiency alters postprandial and adipose tissue metabolism in male mice *Journal of Biological Chemistry* **274** 36219-25

Murray I, Havel PJ, Sniderman AD and Cianflone K (2000) Reduced body weight, adipose tissue, and leptin levels despite increased energy intake in female mice lacking acylation-stimulating protein *Endocrinology* **141** 1041-9

Nagatani S, Zeng Y, Keisler DH, Foster DL and Jaffe CA (2000) Leptin regulates pulsatile luteinizing hormone and growth hormone secretion in the sheep *Endocrinology* **141** 3965-75

Neubert E, Scholze C, Kratzsch J and Gurtler H (1999) Plasma levels of catecholamines and lipolysis during starvation in growing pigs *Zentralblatt Veterinarmedizin A* **46** 247-53

Ntambi JM and Young-Cheul K (2000) Adipocyte differentiation and gene expression *Journal of Nutrition* **130** 3122S-3126S

Ogura K, Irahara M, Kiyokawa M, Tezuka M, Matsuzaki T, Yasui T, Kamada M and Aono T (2001) Effects of leptin on secretion of LH and FSH from primary cultured female rat pituitary cells *European Journal of Endocrinology* **144** 653-8

Perona JS, Portillo MP, Teresa Macarulla M, Tueros AI and Ruiz-Gutierrez V (2000) Influence of different dietary fats on triacylglycerol deposition in rat adipose tissue *British Journal of Nutrition* **84** 765-74

Portillo MP, Chavarri M, Duran D, Rodriguez VM and Macarulla MT (2001) Differential effects of diets that provide different lipid sources on hepatic lipogenic activities in rats under ad libitum or restricted feeding *Nutrition* **17** 467-73

Pralong FP, Gonzales C, Voirol MJ, Palmiter RD, Brunner HR, Gaillard RC, Seydoux J and Pedrazzini T (2002) The neuropeptide Y Y1 receptor regulates leptin-mediated control of energy homeostasis and reproductive functions *FASEB Journal* **16** 712-4

Prunier A and Quesnel H (2000) Influence of the nutritional status on ovarian development in female pigs *Animal Reproduction Science* **60-61** 185-97

Roche JF, Mackey D and Diskin MD (2000) Reproductive management of postpartum cows *Animal Reproduction Science* **60-61** 703-12

Ruiz-Cortes ZT, Men T, Palin MF, Downey BR, Lacroix DA and Murphy BD (2000) Porcine leptin receptor: molecular structure and expression in the ovary *Molecular Reproduction and Development* **56** 465-74.

Ruiz-Cortes ZT, Kennes YM, Gévry NY, Palin MF, Downey BR, Lacroix DA and Murphy BD (2002) Biphasic effects of leptin in porcine granulosa cells *Biology of Reproduction* **in press**

Russell SH, Small CJ, Kennedy AR, Stanley SA, Seth A, Murphy KG, Taheri S, Ghatei MA and Bloom SR (2001) Orexin A interactions in the hypothalamo-pituitary gonadal axis *Endocrinology* **142** 5294-302

Sainsbury A, Schwarzer C, Couzens M, Jenkins A, Oakes SR, Ormandy CJ and Herzog H (2002) Y4 receptor knockout rescues fertility in ob/ob mice *Genes and Development* **16** 1077-88

Saladin R, De Vos P, Guerre-Millo M, Leturque A, Girard J, Staels B and Auwerx J (1995) Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration *Nature* **377** 527-9

Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G and Lodish HF (1995) A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes *Journal of Biological Chemistry* **270** 26746-9

Sekar N, Garmey JC and Veldhuis JD (2000) Mechanisms underlying the steroidogenic synergy of insulin and luteinizing hormone in porcine granulosa cells: joint amplification of pivotal sterol-regulatory genes encoding the low-density lipoprotein (LDL) receptor, steroidogenic acute regulatory (StAR) protein and cytochrome P450 side-chain cleavage (P450scc) enzyme *Molecular and Cellular Endocrinology* **159** 25-35

Smith GD, Jackson LM and Foster DL (2002) Leptin regulation of reproductive function and fertility *Theriogenology* **57** 73-86

Smith MS and Grove KL (2002) Integration of the regulation of reproductive function and energy balance: lactation as a model *Frontiers of Neuroendocrinology* **23** 225-56

Spicer LJ, Crowe MA, Prendiville DJ, Goulding D and Enright WJ (1992) Systemic but not intraovarian concentrations of insulin-like growth factor-I are affected by short-term fasting *Biology of Reproduction* **46** 920-5

Spicer LJ (2001) Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction *Domestic Animal Endocrinology* **21** 251-70

Steppan CM, Bailey SM, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS and Lazar MA (2001a) The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* **409** 307-312

Steppan CM, Brown EJ, Wright CM, Bhat S, Banerjee RR, Dai CY, Enders GH, Silberg DG, Wen X, Wu GD and Lazar MA (2001b) A family of tissue-specific resistin-like molecules *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **98** 502-6

Sul HS, Latasa MJ, Moon Y and Kim KH (2000) Regulation of the fatty acid synthase promoter by insulin *Journal of Nutrition* **130** 315S-320S

Tao Y, Cianflone K, Sniderman AD, Colby-Germinario SP and Germinario RJ (1997) Acylation-stimulating protein (ASP) regulates glucose transport in the rat L6 muscle cell line *Biochimica et Biophysica Acta* **1344** 221-9

Tena-Sempere M, Manna PR, Zhang FP, Pinilla L, Gonzalez LC, Dieguez C, Huhtaniemi I and Aguilar E (2001) Molecular mechanisms of leptin action in adult rat testis: potential targets for leptin-induced inhibition of steroidogenesis and pattern of leptin receptor messenger ribonucleic acid expression *Journal of Endocrinology* **170** 413-23

Walczak R and Tontonoz P (2002) PPARadigms and PPARadoxes.

Expanding roles for ppar gamma in the control of lipid metabolism *Journal of Lipid Research* **43** 177-86

White RT, Damm D, Hancock N, Rosen BS, Lowell BB, Usher P, Flier JS and Spiegelman BM (1992) Human adiponin is identical to complement factor D and is expressed at high levels in adipose tissue *Journal of Biological Chemistry* **267** 9210-3

Williams GL, Amstalden M, Garcia MR, Stanko RL, Nizielski SE, Morrison CD and Keisler DH (2002) Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle *Domestic Animal Endocrinology* **23** 339-49

Wiltbank MC, Gumen A and Sartori R (2002) Physiological classification of anovulatory conditions in cattle *Theriogenology* **57** 21-52

Woller M, Tessmer S, Neff D, Nguema AA, Roo BV and Waechter-Brulla D (2001) Leptin stimulates gonadotropin releasing hormone release from cultured intact hemihypothalami and enzymatically dispersed neurons *Experimental Biology and Medicine (Maywood)* **226** 591-6

Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P and Kadowaki T (2001) The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity *Nature Medicine* **7** 941-6

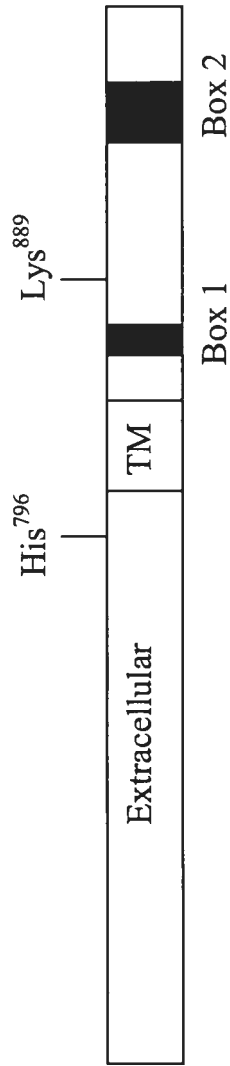
Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, Tanaka S, Matsuzawa Y, Chao CL, Chen CL, Tai TY and Chuang LM (2001) Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **86** 3815-9

Yoon JC, Chickering TW, Rosen ED, Dussault B, Qin Y, Soukas A, Friedman JM, Holmes WE and Spiegelman BM (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma target gene encoding a novel angiopoietin-related protein associated with adipose differentiation
Molecular and Cellular Biology **20** 5343-9

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L and Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue *Nature* **372** 425-32

Adipose secretory element	Role and potential role in reproduction	Reference
Leptin	Regulation of appetite, gonadotropin secretion, steroidogenesis	(Zhang <i>et al.</i> , 1994)
Tumor necrosis factor- α	Autocrine-paracrine regulator of adipogenesis Inhibitory to ovarian function.	(Walczak and Tontonoz, 2002) for review
Interleukin-6	Inflammatory processes. Inhibitory to ovarian function, apoptosis in the ovary	(Walczak and Tontonoz, 2002) for review
Resistin	Reduces insulin sensitivity of peripheral tissues	(Steppan <i>et al.</i> , 2001)
Adiponectin (ARCP 30)	Increases insulin sensitivity and LDL uptake by peripheral tissue	(Scherer <i>et al.</i> , 1995)
Acylation stimulating protein	Short term increase in appetite, fatty acid and glucose uptake by tissues	(Cianflone <i>et al.</i> , 1989; Murray <i>et al.</i> , 1999; Maslowska <i>et al.</i> , 1997)
Adipsin complement factor D	Cleaves acylation stimulating protein from complement C	(Yamauchi <i>et al.</i> , 2001)
PPAR γ angiopoietin related (PGAR) or Fasting induced adipose factor (FIAF)	Effects unknown	(Kersten <i>et al.</i> , 2000; Yoon <i>et al.</i> , 2000)

Table I. Adipose secretory elements and their roles in reproductive and other biological processes.



- OB-Ra

$\text{N}^{886}\text{F}^{887}\text{Q}^{888}\text{K}^{889}$ RDTL^*
- OB-Rb

$\text{N}^{886}\text{F}^{887}\text{Q}^{888}\text{K}^{889}$ PETFEHLFTKHAESVIFGPLLLEPEPISEEISVDTAWK
NKDEMVPAAAMVSLLLTTPDPRESSICISDQCNSANF
SGSQSTQVTCEDQCQRQPSVKYATLVNDKL VETDE
EQGFHSPVSNCISSNHSPLRQSFSSSSWETEAQTFF
LLSDQQPTMISPLSFSGLDLLELGSEPEENHREKS
VCYLGVTSVNRRESGVLLTGEAGILCTFPAQCCLFSDI
RILQERCSHFVENNLSLGTSGENFVPYMPQFQTCSTH
SHKIMENKMCDLTV*
- OB-Rc

$\text{N}^{886}\text{F}^{887}\text{Q}^{888}\text{K}^{889}$ VTV^*
- OB-Rd

$\text{N}^{886}\text{F}^{887}\text{Q}^{888}\text{K}^{889}$ DISFHEVFIFR^*
- OB-Re

$\text{F}^{793}\text{Y}^{794}\text{I}^{795}\text{H}^{796}$ GMCTVLFMD^*

Figure 1. The leptin receptor is alternatively spliced. A representation of the leptin receptor is shown at the top, including putative motifs for the transmembrane domain (TM) and those for JAK binding, 'Box 1' and 'Box 2'. The numbers of the amino acids refer to the published OB-R sequence. Until Lys 889, clones sequences were identical at which point the predicted protein diverged. These mRNAs are designated OB-Ra, OB-Rb, OB-Rc and OB-Rd and their predicted amino acid sequence are shown. OB-Ra corresponds to the published mouse OB-R, and OB-Rb corresponds to the human OB-R. OB-Ra, OB-Rb, OB-Rc and OB-Rd predict a Box 1 motif, and OB-Rb also predicts a peptide potentially homologous to Box 2 (underlined). Independent cDNA clones were identical to the leptin receptor upstream of His 796, at which point the nucleotide sequences diverged (OB-Re). Its nucleotide sequence predicts a soluble receptor (From Gwo-Hwa Lee et al., Nature 379: 632-35, 1996).

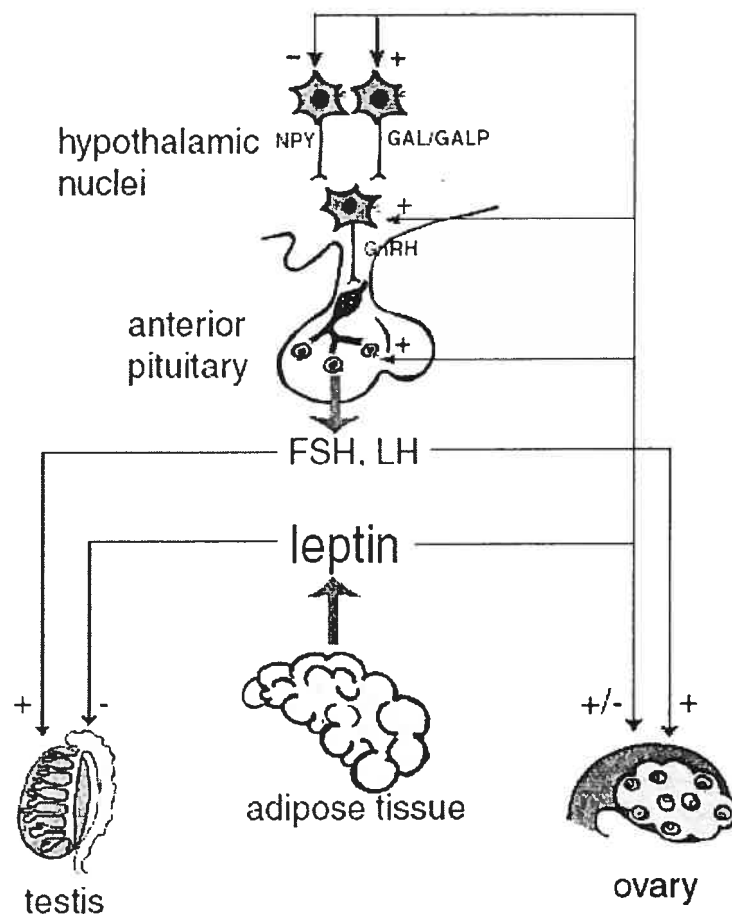


Figure 2. Sites and mode of action of leptin in the mammalian hypothalamo-hypophysial-gonadal axis. Leptin, synthesized primarily by adipose tissue, attenuates the receptor specific and estrogen-dependent NPY mediated GnRH-inhibition. Leptin also has a positive influence on galanin (GAL) and galanin like peptide (GALP) neurons that impinge on GnRH neurons, resulting in GnRH secretion. Leptin has direct, positive effects on GnRH neurons, resulting in GnRH secretion. There is evidence that leptin has direct effects on the gonadotropes of the anterior pituitary, increasing sensitivity to GnRH and consequently, increasing gonadotropin secretion. Gonadotropins act directly on the testis and ovary to stimulate steroidogenesis, while leptin has variable effects on the gonads (see Figure 3).

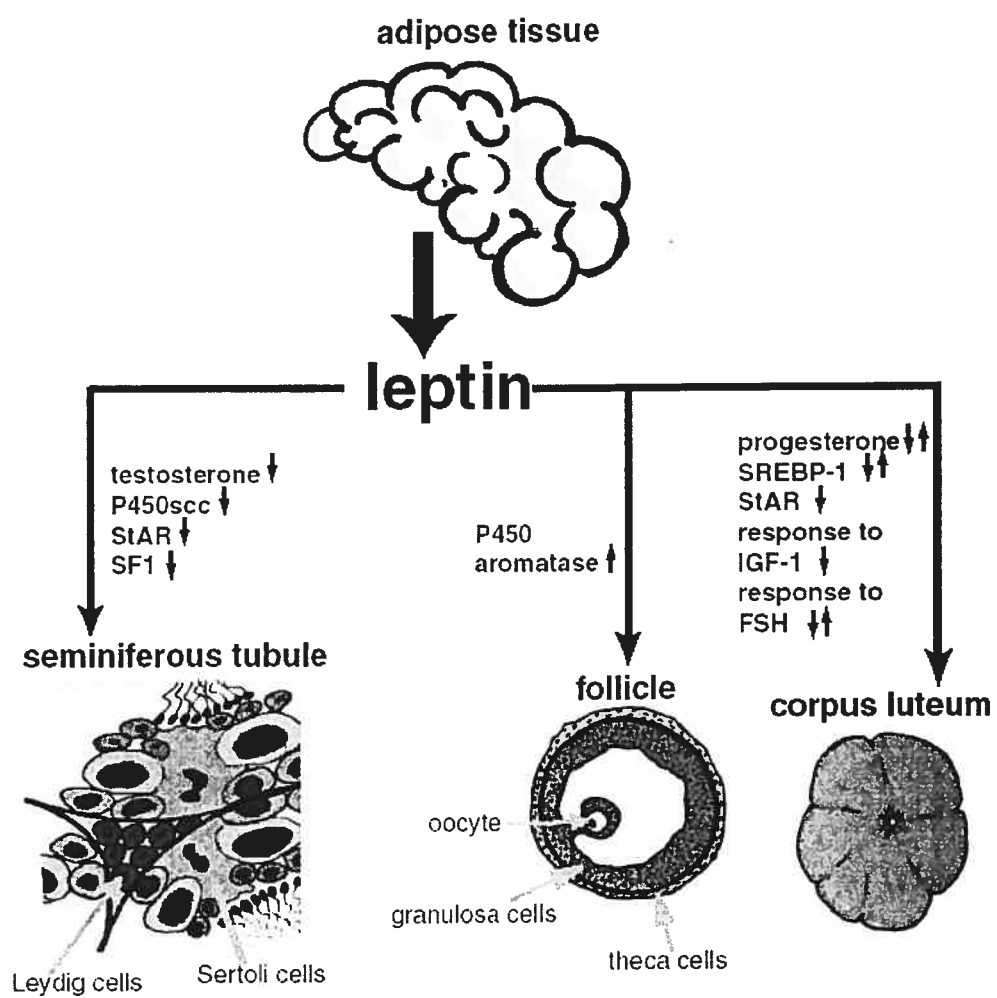
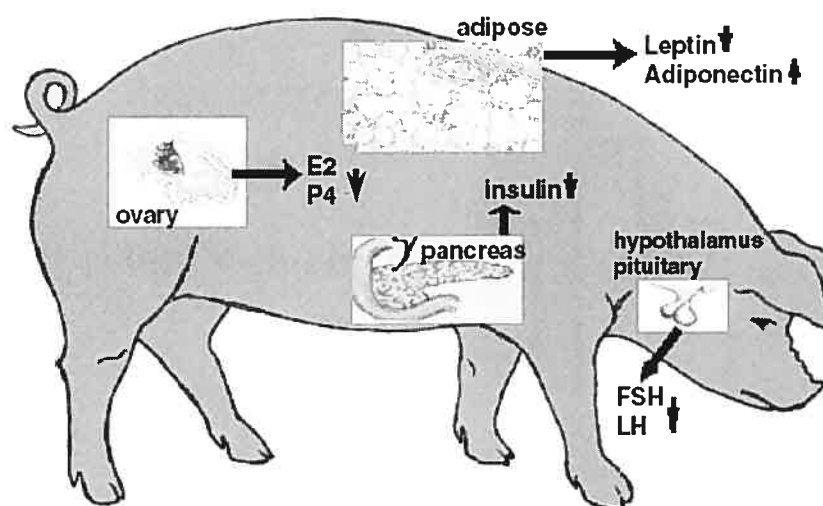


Figure 3. Leptin has direct effects on the gonads. In the ovarian follicle, leptin has positive effects on the rate limiting enzyme of estrogen synthesis, cytochrome P450aromatase. Its effects on granulosa and luteal cells in culture vary among doses used and cell models employed. High doses, usually in excess of physiological levels, interfere with progesterone synthesis, first, by reducing the response to FSH and IGF, secondly by reducing the transcription factor SREBP and consequent transcription of the rate limiting factor in steroidogenesis, steroidogenic acute regulatory protein (StAR). In some studies, physiological doses have no effect. In other reports (Ruiz-Cortés *et al.*, 2002), physiological concentrations of leptin stimulate a cascade of events leading to progesterone synthesis, including the SREBP cleavage and StAR gene expression. In the testis, leptin has negative effects on StAR, cytochrome P450side change cleavage enzyme (P450scc) and the transcription factor, SF-1.

A. Fasting or malnutrition



B. Refeeding

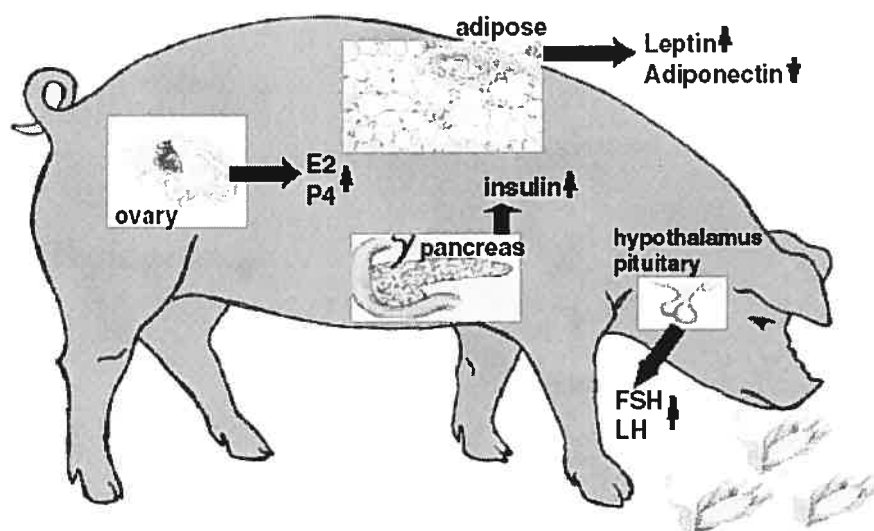


Figure 4. Simplified model to explain the effects of malnutrition or fasting and refeeding on ovulation rates in litter bearing species. **A.** Short or long term reduction in nutrient intake reduces adipose mass and synthesis of leptin, causing attendant loss of the gonadotropin-stimulating effects of leptin. Insulin output by the pancreas is also lowered. Concurrent increases in adiponectin increase the sensitivity of peripheral tissues to the lower levels of insulin. Ovarian activity and steroidogenesis is reduced. **B.** Refeeding increases insulin secretion, leptin synthesis and secretion, and, leptin in concert with insulin, increases gonadotropin secretion. Ovarian and hypothalamic tissues have increased sensitivity to insulin due to the effects of adiponectin during fasting. The gonadotropins interact with insulin to induce ovarian folliculogenesis and the cascade of events leading to ovulation.

OBJECTIFS ET HYPOTHÈSE DE TRAVAIL

Les objectifs spécifiques de cette thèse sont de cloner des ADNc porcins du récepteur de leptine. Par la suite, étudier le patron d'expression de ce récepteur dans l'ovaire porcin, pendant la lutéinisation *in vivo* et *in vitro*. Dans un troisième temps, l'objectif est de vérifier les propriétés fonctionnelles des récepteurs par l'étude des voies de signalisation interne déclenchées par la leptine sur des cellules de granulosa porcine *in vitro*.

L'accomplissement de ces objectifs va permettre de prouver l'hypothèse générale de l'étude soit que la leptine, messager métabolique dans le système reproducteur du porc, exerce une action directe dans l'ovaire.

Pour l'étude d'un ligand et de ses potentiels effets sur des différents cibles tissulaires, un premier pas logique est de vérifier la présence des récepteurs pour ce ligand. Chez le porc, le récepteur de leptine n'ayant pas été caractérisé, son clonage, sa description moléculaire, sa comparaison avec d'autres espèces et l'étude de son expression, s'avèrent indispensables pour commencer la présente étude.

CHAPITRE II

Porcine Leptin Receptor: Molecular Structure and Expression in the Ovary

Z. Tatiana Ruiz-Cortés*, Taoyan Men*, Marie-France Palin, Bruce R. Downey***, Dan A. Lacroix*, and Bruce D. Murphy***

* Centre de recherche en reproduction animale, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

** Agriculture and Agri-Food Canada, Dairy and Swine Research and Development Centre, P.O. Box 90, Lennoxville, Quebec, Canada J1M 1Z3

*** Dept. of Animal Science, McGill University, Saint-Anne-de-Bellevue, Quebec, Canada H9X 3V9

Corresponding author: Z. Tatiana Ruiz-Cortés, Centre de recherche en reproduction animale, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6;

Facsimile: (450) 778-8103

Abbreviated title: The Porcine Leptin Receptor

Key Words: Porcine granulosa cells, luteinization, porcine leptin, leptin receptor.

The sequence of the porcine leptin receptor reported herein has been deposited in GenBank (accession number AF 092422)

Porcine Leptin Receptor: Molecular Structure and Expression in the Ovary

Z. TATIANA RUIZ-CORTÉS,^{1*} TAOYAN MEN,¹ MARIE-FRANCE PALIN,² BRUCE R. DOWNEY,³ DAN A. LACROIX,¹ AND BRUCE D. MURPHY¹

¹Centre de recherche en reproduction animale, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada

²Agriculture and Agri-Food Canada, Dairy and Swine Research and Development Centre, Lennoxville, Québec, Canada

³Department of Animal Science, McGill University, St.-Anne-de-Bellevue, Québec, Canada

ABSTRACT The porcine leptin receptor complementary DNA was cloned and sequenced and the leptin receptor gene expression evaluated in the porcine ovary. An open reading frame of 3498 nt cDNA was amplified from pig liver mRNA by RT-PCR. Sequence homology with the extracellular, transmembrane, and cytoplasmic domains of human, mouse, rat, sheep, and cow leptin receptors varied between 45% and 90%. Leptin receptor mRNA was present in porcine kidney, liver, spleen, lung, brain, testis, uterus, ovary, corpus luteum (CL), theca, and granulosa cells. The abundance of leptin receptor transcripts and protein varied during luteinization of granulosa cells in vitro and in the CL during the pig luteal phase. In the postovulatory CL, both mRNA and protein were low but detectable, maximal expression was observed in the midcycle CL, and lowest abundance occurred in regressed CL. Leptin receptor mRNA was present in granulosa cells at isolation and increased in abundance as the cells luteinized over 96 hr in culture. Leptin receptor protein was detectable after 12 hr of in vitro luteinization. We conclude that leptin receptor is expressed in granulosa and luteal cells, and varies during pig ovarian cell differentiation. *Mol. Reprod. Dev.* 56:465–474, 2000. © 2000 Wiley-Liss, Inc.

Key Words: porcine granulosa cells; luteinization; porcine leptin; leptin receptor

INTRODUCTION

Leptin (from the Greek leptos = thin), identified in late 1994 (Zhang et al.), was first described as an adipocyte-derived signaling factor which induces a complex response, including control of body weight and energy expenditure. More recent observations suggest that leptin, in addition to its role in metabolic control, plays important roles in neuroendocrine signaling and reproduction (Auwerx and Stael, 1998).

Leptin signaling is accomplished via a receptor with sequence homology placing it in the Class I cytokine family (Tartaglia et al., 1995). Alternative splicing of the leptin receptor gene results in a panoply of protein products that, for the most part, vary in the length of

the intracellular domain (Murakami et al., 1997) and, consequently, vary in their capacity for signal transduction (Ghilardi and Skoda, 1997). One splice variant lacks the transmembrane domain, and may represent a soluble form (Gavrilova et al., 1997).

Consistent with a role for leptin in controlling food intake and energy metabolism, leptin receptors have been found in the hypothalamic center responsible for satiety (Tartaglia et al., 1995). In addition, leptin receptors exhibit widespread distribution in mammalian tissue, including liver, heart, kidney, lung, small intestine, testes, ovaries, spleen, pancreas, and adipose tissue (Lee et al., 1996). Thus, leptin may have peripheral effects, not only in regulating its own secretion (Zhang et al., 1997), but also on processes fundamental to metabolism and reproduction (Fruhbeck et al., 1998).

There are clear central effects of leptin on reproduction, which has led to the suggestion that leptin is the missing link between fat and fertility (Conway and Jacobs, 1997). Obese (*ob/ob*) mice with a mutation in the leptin gene resulting in a premature stop codon are infertile, have subnormal gonadotrophin concentrations and hypogonadism (Zhang et al., 1994). Weight loss alone, by dietary restriction of the *ob/ob* mouse, does not reverse infertility (Zhang et al., 1994). Leptin administration to female *ob/ob* mice, however, results in a prompt return of fertility, presumably through a neural cascade resulting in release of GnRH (Chehab et al., 1996). Indeed, Barash et al., (1996) have shown that leptin-treated *ob/ob* mice have higher serum concentrations of LH (more pronounced in females) and FSH (more pronounced in males) compared with pair fed, saline-treated mutant animals. They also

Grant sponsor: Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada; Grant number: STR0202133.

The sequence of the porcine leptin receptor reported herein has been deposited in GenBank (accession number AF 092422).

*Correspondence to: Z. Tatiana Ruiz-Cortés, Centre de recherche en reproduction animale, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada [REDACTED]

Received 17 December 1999; Accepted 30 March 2000

RÉSUMÉ

L'ADN complémentaire du récepteur de la leptine porcine a été cloné et séquencé et son expression dans l'ovaire, évaluée. Le cadre de lecture ouvert de 3498 nt de l'ADNc a été amplifié à partir de l'ARNm de foie par transcription reverse-polymérisation en chaîne (RT-PCR). L'homologie des séquences des domaines extracellulaire, transmembranaire et cytoplasmique du récepteur entre l'humain, la souris, le rat, la brebis et la vache se situe entre 45% et 90%. L'ARNm du récepteur de la leptine porcine a été détecté dans les reins, le foie, la rate, les poumons, le cerveau, les testicules, l'utérus, les ovaires, les corps jaunes (CL), les cellules lutéales et les cellules de granulosa. L'abondance des transcrits du récepteur de la leptine et de sa protéine varient *in vitro* pendant la lutéinisation des cellules de granulosa et *in vivo* dans les CL du porc pendant la phase lutéale du cycle oestral. Dans le CL postovulatoire, les niveaux d'ARNm et de la protéine sont très faibles, mais détectables. *In vivo*, l'expression maximale des ARNm et de la protéine du récepteur dans le CL a été observée au milieu de la phase lutéale alors que l'expression la plus faible était observée pendant la régression de cette structure. *In vitro*, l'ARNm du récepteur est présent dans les cellules de granulosa fraîches et son abondance augmente progressivement pendant la lutéinisation des cellules en culture pour atteindre un pic à 96 h. La protéine du récepteur a été détectée après 12 h de lutéinisation *in vitro*. Nous avons conclu que le récepteur de leptine était présent dans les cellules de granulosa et lutéales et que son patron d'expression varie pendant la différenciation des cellules ovariennes chez le porc.

ABSTRACT

The porcine leptin receptor complementary DNA was cloned and sequenced and the leptin receptor gene expression evaluated in the porcine ovary. An open reading frame of 3498 nt cDNA was amplified from pig liver mRNA by RT-PCR. Sequence homology with the extracellular, transmembrane and cytoplasmic domains of human, mouse, rat, sheep and cow leptin receptors varied between 45% and 90%. Leptin receptor mRNA was present in porcine kidney, liver, spleen, lung, brain, testis, uterus, ovary, corpus luteum (CL), theca and granulosa cells. The abundance of leptin receptor transcripts and protein varied during luteinization of granulosa cells *in vitro* and in the CL during the pig luteal phase. In the postovulatory CL, both mRNA and protein were low but detectable, maximal expression was observed in the midcycle CL, and lowest abundance occurred in regressed CL. Leptin receptor mRNA was present in granulosa cells at isolation and increased in abundance as the cells luteinized over 96 h in culture. Leptin receptor protein was detectable after 12 h of *in vitro* luteinization. We conclude that leptin receptor is expressed in granulosa and luteal cells, and varies during pig ovarian cell differentiation.

INTRODUCTION

Leptin (from the Greek leptos=thin), identified in late 1994 (Zhang et al.), was first described as an adipocyte-derived signaling factor which induces a complex response, including control of body weight and energy expenditure. More recent observations suggest that leptin, in addition to its role in metabolic control, plays important roles in neuroendocrine signaling and reproduction (Auwerx and Stael, 1998).

Leptin signaling is accomplished via a receptor with sequence homology placing it in the Class I cytokine family (Tartaglia et al., 1995). Alternative splicing of the leptin receptor gene results in a panoply of protein products that, for the most part, vary in the length of the intracellular domain (Murakami et al., 1997) and, consequently, vary in their capacity for signal transduction (Ghilardi and Skoda, 1997). One splice variant lacks the transmembrane domain, and may represent a soluble form (Gavrilova et al., 1997).

Consistent with a role for leptin in controlling food intake and energy metabolism, leptin receptors have been found in the hypothalamic center responsible for satiety (Tartaglia et al., 1995). In addition, leptin receptors exhibit widespread distribution in mammalian tissue, including liver, heart, kidney, lung, small intestine, testes, ovaries, spleen, pancreas, and adipose tissue (Lee et al., 1996). Thus, leptin may have peripheral effects, not only in regulating its own secretion (Zhang et al., 1997), but also on processes fundamental to metabolism and reproduction (Fruhbeck et al., 1998).

There are clear central effects of leptin on reproduction, which has led to the suggestion that leptin is the missing link between fat and fertility (Conway and Jacobs, 1997). Obese (*ob/ob*) mice with a mutation in the leptin gene resulting in a premature stop codon are infertile, have subnormal gonadotrophin concentrations and hypogonadism (Zhang et al.,

1994). Weight loss alone, by dietary restriction of the *ob/ob* mouse, does not reverse infertility (Zhang et al., 1994). Leptin administration to female *ob/ob* mice, however, results in a prompt return of fertility, presumably through a neural cascade resulting in release of GnRH (Chehab et al., 1996). Indeed, Barash et al., (1996) have shown that leptin-treated *ob/ob* mice have higher serum concentrations of LH (more pronounced in females) and FSH (more pronounced in males) compared with pair fed, saline-treated mutant animals. They also reported an increase in weight of *ob/ob* mouse reproductive organs after leptin treatment, which may have resulted from gonadotrophin stimulation and/or from a direct effect of leptin on the gonad.

The leptin receptor is expressed in the human ovary (Karlsson et al., 1997) and leptin is found in human follicular fluid (Cioffi et al., 1997), providing the potential for direct effects of this hormone on the ovary. To date, *in vitro* investigations have suggested both stimulation and inhibition of ovarian processes by leptin.

The leptin gene is present in pigs, and displays 85-92 % homology with its bovine, human and mouse orthologues (Bidwell et al., 1997; Mendiola et al., 1997; Ramsay et al., 1998, Robert et al., 1998). Leptin mRNA levels correlate directly with adipose reserves in the pig (Robert et al., 1998), and serum leptin concentrations are reduced by feed restriction in this species (Mao et al., 1999). Recombinant leptin, infused directly into pig cerebral ventricles, attenuates appetite and stimulates growth hormone secretion (Barb et al., 1998). Little is known about the porcine leptin receptor except that its gene resides on porcine chromosome 6 (Ernst et al., 1997), and that at least one restriction fragment length polymorphism is present (Stratil et al., 1998).

The purposes of this investigation were to determine the sequence and homology of the porcine leptin receptor and its expression during *in vivo* and *in vitro* differentiation of ovarian cells.

MATERIALS AND METHODS

Tissue collection and cell culture

Variation in the expression of leptin receptor gene during luteinization *in vivo* was investigated in corpora lutea (CL) from abattoir-derived ovaries from cycling adult gilts at various stages of the estrous cycle. Five categories of CL were identified by gross morphological criteria (Akins and Morrisette 1968) and confirmed by histological analysis (Pescador et al., 1999). These were the postovulatory CL (stage I) mid-cycle (early, stage II and late, stage III) and regressing CL (stage IV and R). Three to five CL from each stage were collected for Northern and Western analysis.

Granulosa cells were aspirated from medium-sized (3-5mm) follicles of ovaries from prepubertal gilts and cultured as previously described (Li et al., 1995). Briefly, $7-9 \times 10^6$ viable cells/ml were pooled in minimum essential medium (MEM, Gibco BRL, Burlington, ON) containing 1 mg/l insulin (Sigma, Oakville, ON), 0.1 mM non-essential amino acids (Gibco BRL), 5×10^4 UI/l penicillin (Gibco BRL), 50 μ g/l streptomycin (Gibco BRL), 0.5mg/l fungizone (Gibco BRL), and 10% fetal calf serum (Gibco BRL). Incubation was carried at 37 °C. At 48 h after initiation of culture, the cells were washed, and medium was replaced with serum-free medium. Cultures were terminated at 12, 24, 48, 72 and 96 h. This corresponds to the period of luteinization *in vitro*, as indicated by the loss of cytochrome P450 aromatase, the acquisition of the expression of steroidogenic acute regulatory protein and progesterone synthetic capability, and a change in

cellular morphology from the round granulosa to the cobblestone epithelial phenotype (Pescador et al., 1999; Murphy, 2000).

Leptin Receptor Cloning and Sequencing

A reverse transcription-polymerase reaction (RT-PCR) strategy was adopted for cloning the porcine leptin receptor. The RT reaction was performed for 90 min at 42 C using Superscript II (Gibco/BRL) in total volume of 20 µl containing 5 µg of total RNA from pig liver and 20 pmol antisense primer (plept-r 2. Table 1). The PCR amplifications were performed in a final volume of 100 µl containing 10 µl of 10 x PCR buffer (0.5 M Tris pH 9, 15mM MgCl₂, 0.2 M NH₂SO₄), 20 pmol of each sense and antisense primers, 20 nmol of dNTP, 1 µl (5 units) Taq DNA polymerase (Pharmacia, Baie D'Urfè, PQ) and 5 µl RT product. Volume was completed by adding dimethylpyrocarbonate treated H₂O. The PCR amplifications were performed in a Hybaid Omnigene Thermal Cycler (Intersciences, Markham, ON) for 40 cycles programmed 45 sec at 94 C, 45 sec at 52 C and 2 min at 72 C and followed by an extension amplification of 10 min at 72 C at the end of the PCR reaction.

The PCR products were size-fractionated by electrophoresis on 1% agarose gels which were stained with ethidium bromide (Sigma, Oakville, ON) for visualization under UV illumination. The amplified fragments were excised from the gel and purified by Sephaglas bandpreps (Pharmacia), ligated into pGEM-T vector using T4 DNA ligase according to the instructions of the manufacturer (Promega, Nepean, ON) and ligation products were transformed into *Escherichia coli* JM 109 cells. Positive clones were selected and subsequently sequenced by means of a T7 Sequencing Kit (Pharmacia). To guard against misincorporation of nucleotides by Taq polymerase during PCR amplification, three

independent clones were sequenced for each gene fragment, and the consensus sequence taken.

Oligonucleotide primers

The primers (Table 1, Gibco/BRL) for cloning of the leptin receptor cDNA were designed from GenBank fragments of cDNA sequences from pig leptin receptor (Accession numbers U67739, U72070, AJ223162 AJ223163) and from conserved regions of cDNA sequences from human, mouse and rat (Takaya et al., 1996) leptin receptor coding sequences (Accession numbers U43168, U58861, D85558).

RNA analysis

Tissues and cultured cells were homogenized in 4 M guanidine isothiocyanate (Gibco BRL), 26.5 mM sodium acetate (Sigma, St. Louis MO), and 0.12 M beta-mercaptoethanol (Sigma), and stored at -70°C until analysis. Total RNA was purified by centrifugation through a density gradient of 5.7 M CsCl. The concentration was determined by spectrophotometric measurement at 260 nm. Aliquots of 15 μg were subjected to electrophoresis on 1% agarose-formaldehyde gels using a 20 mM morpholinopropanesulfonic acid buffer (pH 7.0), transferred overnight to nylon membranes and cross-linked for 30 sec at 150 mJ in a UV chamber (Bio-Rad GS Gene Linker, Richmond, CA). Blots from tissues collected from the abattoir and from cell culture were then hybridized in sequence with two probes. The first was a 5' fragment of 1.3 kb cDNA of the leptin receptor cDNA. The second was a 1.4 kb fragment from an internal region of the human 28S rRNA gene, provided by Dr. G. Schultz (Univ. Calgary). The probes were labeled with $\alpha^{32}\text{P}$ to specific activity of $1.5\text{--}3.0 \times 10^9$ dpm/ μg by random primer synthesis using a kit from Boehringer Mannheim (Laval, PQ). Hybridization was conducted as previously described (Chedrese et al., 1990), followed by two high

stringency washes at 60 C. Hybridized blots were then autoradiographed. To provide a quantitative estimate of leptin receptor mRNA, the most prominent leptin receptor transcript (4.4 kb) and the corresponding 28S band on autoradiograms were scanned. The optical density was calculated by means of a computer imaging system and the areas under curves were integrated by means of the Macintosh NIH program (National Institute of Health, Bethesda MD) and summed. The means of the dimensionless ratio between the sum of the mRNA band and 28S RNA were calculated for graphical representation.

Leptin receptor protein analysis

For Western blotting, portions of corpora lutea and solubilized granulosa cell extracts were homogenized on ice in TED buffer (50 mM Tris, pH 8.0; 10 mM EDTA and 1 mM of diethyldithiocarbamic acid, DEDTC) containing 2 mM octyl glucoside and centrifuged at 30,000 x g for 1 h at 4 C. Mouse pituitary was used as a positive control. The crude pellets (membranes, nuclei, and mitochondria) were sonicated (8 s/cycle, three cycles) in TED sonication buffer (20 mM Tris, pH 8.0; 50 mM EDTA; and 0.1 mM DEDTC) containing 32 mM octyl glucoside. The sonicates were centrifuged at 16,000 x g for 15 min at 4 C. The supernatants (solubilized cell extract) were stored at -70 C until electrophoresis was performed. The protein concentration was determined by the Bradford (Bio-Rad, Mississauga ON) protein assay. Proteins (50 µg) in cell extracts were resolved by one dimensional 5% SDS-PAGE minigel for 45 min at 200 V, then electrophoretically transblotted to nitrocellulose membranes. The membranes were washed in 0.1% (v/v) Tween 20 in Tris buffered saline (TTBS: 100 mM Tris, 0.9% sodium chloride, pH 7.5) and incubated with primary antibodies raised against a peptide from the extracellular domain of the mouse leptin receptor

(Ghilardi et al., 1996). The second antibody, biotinylated goat anti-rabbit IgG, was added in the same buffer. A preformed macromolecular complex between avidin and biotinylated enzyme (horseradish peroxidase), which still retains biotin-binding (Vectastain ABC system, Vector lab, Burlingame, CA) was then added. The signal was detected by adding the peroxidase substrate, 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma), which produces a red-brown stain at the site of second antibody binding. The optical density of protein bands was determined by scanning to provide a quantitative estimate of leptin receptor protein by means of the Macintosh NIH program, as described for Northern analysis.

Statistical analyses

Optical density data from mRNA and protein scans were subjected to Shapiro's test to determine normality of distribution and Bartlett's test for the homogeneity of variance. In the absence of homogenous variance, the analysis was performed on square root-transformed data. Analysis of covariance was then conducted employing the 28S values as the covariant and, in the presence of significant F values, individual comparisons were made by the Tukey-Kramer test. Correlation analysis was performed to examine the relationship between the abundance of leptin receptor mRNA and leptin receptor protein. The level of probability selected to determine significance was $p < 0.05$.

RESULTS

Cloning and sequence analysis of porcine leptin receptor cDNA

A cDNA consisting of 4050 nt, cloned from pig liver mRNA was sequenced (GenBank, accession number AF092422). This fragment comprised the open reading frame of 3498 nt encoding a deduced protein of 1166 amino acids with a predicted molecular mass of 140 KDa, 15 nt of the 5' end untranslated region and the entire 3' end untranslated region of

537 nt. The deduced amino acid sequence of the pig leptin receptor (Fig. 1) contains 59 potential sites for N-linked glycosylation (Asn) and 33 cysteines for potential formation of disulfide bonds. There is a relatively high degree of homology of the deduced sequence with human, rat and mouse orthologues (90%, 92% and 93% respectively; Bennett et al., 1996; Takaya et al., 1996; Ghilardi et al., 1996). The sequence of the pig receptor further indicates the presence of conserved extracellular, transmembrane and intracellular domains (Fig. 2). Extracellular domain homologies with other species are: human 85 % (Bennett et al., 1996), rat 55% (Takaya et al., 1996) and mouse 55% (Ghilardi et al., 1996). Transmembrane domain homologies are higher, with 90 % (Bennett et al., 1996), 86% (Takaya et al., 1996) and 86% (Ghilardi et al., 1996) for human, rat and mouse respectively. The cytoplasmic domain homologies vary from 78% (Bennett et al., 1996), 78% (Dyer et al., 1997) and 72% (Pfister-Genskow, 1997) in the human, sheep and cow to 48 % (Takaya et al., 1996) and 45% (Ghilardi et al., 1996) in the rat and the mouse, respectively. The porcine signal sequence is highly conserved relative to the human sequence, but less so relative to rat and mouse sequences. The putative leptin binding region is highly conserved (Fig. 2).

Tissue distribution of leptin receptor mRNA

In Northern analysis, the homologous probes derived from the extracellular domain of the leptin receptor hybridized with four fragments of mRNA, at 1.3, 1.5, 4 and 4.4 kb, with the latter being the most prominent, and therefore used for further analysis. Leptin receptor mRNA was present in all tissues examined. Statistical analysis revealed that kidney and freshly isolated granulosa cells had lowest relative abundance of leptin receptor transcripts, while liver, spleen and lung had the highest (

$p < 0.05$, Fig. 3). Brain, testis, uterus, whole ovary, CL and theca cells had intermediate levels.

Leptin receptor expression in the corpus luteum

Leptin receptor transcript abundance varied through the porcine luteal phase ($p < 0.05$, Fig. 4a). In the postovulatory CL (stage I) the levels were low but detectable, as was the case in the late luteal phase (regression, stage R). During the early and late midcycle (stages II and III) maximal expression of leptin receptor mRNA was detected, 4-10 fold greater than stage IV and R ($p < 0.05$).

Cellular proteins isolated from the porcine CL and from the mouse pituitary reacted with the leptin receptor antibody raised against a peptide of the mouse leptin receptor (Fig. 4b). Two or more bands were consistently present with the major protein band migrating at approximately 175 kDa. In the mouse pituitary, the antibody reacted with a second band of approximately 130 kDa, not present in pig ovarian tissue. In both species there were two further bands, a variably present minor band which migrated at approximately 100 kDa, and a second protein band at approximately 80 kDa consistently present. The largest form (175 kDa) was consistent with a posttranscriptionally modified version of the long isoform of the receptor in other species. Densitometric analysis revealed the abundance of this protein fluctuated concurrent with its 4.4 kb mRNA ($r = 0.8706$, $p < 0.05$), and CLIII samples contained 3-4 fold greater protein abundance than those of CLI or CLR ($p < 0.05$, Fig. 4b). The abundance of the 80 kDa form was constant among stages I-IV of the CL, but was reduced ($p < 0.05$) to approximately 15 % of peak abundance in samples from regressed CL (data not shown).

Leptin receptor expression during in vitro luteinization

Leptin receptor mRNA was present in freshly isolated granulosa cells from 3.5 mm follicles, and its abundance underwent a two-fold increase at 72 and 96 h in culture ($p < 0.05$), concurrent with the *in vitro* luteinization of these cells (Fig. 5a). The leptin receptor protein was expressed in newly isolated granulosa cells and at 12 h in culture and transcript abundance increased by 60% at 72h and by 80% at 96h (Fig.5b).

DISCUSSION

Sequence analysis of porcine leptin receptor cDNA

To our knowledge, this is the first report of the complete coding sequence of the porcine leptin receptor, and it indicates that the gene is conserved relative to other mammals. The open reading frame codes for a deduced protein of 1166 amino acids indicating that this species has, as a minimum, the long (Ob-b) isoform of the mouse and human receptor proteins (Ghilardi et al., 1996; Tartaglia, 1997). Of 66 and 67 potential glycosylation sites present in the human (Bennett et al., 1996) and the rat (Takaya et al., 1996) respectively, 59 appear conserved in the deduced amino acid sequence of pig leptin receptor (Fig. 1). The pig leptin receptor has 33 cysteine residues for the potential formation of disulfide bonds compared to 39, 38 and 38 in the human (Bennett et al., 1996), rat (Takaya et al., 1996) and mouse (Ghilardi et al., 1996), respectively (Fig. 1). Disulfide structure and N-glycosylation analysis of the extracellular domain of the human leptin receptor were undertaken by Haniu *et al.* (1998) and cysteine residues are present in the pig sequences corresponding to all nine sites of Cys bridges formed in the human sequence. The pig sequence further displays Asn residues corresponding to 16 of 18 N-linked glycosylation sites in the human extracellular domain, but it lacks the N-

linked sites present at residues 23 and 688 of the human sequence (Haniu et al., 1998).

Other homologies are evident, including two conserved Trp-Ser-X-Trp-Ser motifs present in the gp130 cytokine receptor and the mouse leptin receptor (Tartaglia et al., 1995). It is not unexpected that the putative extracellular domain of the pig leptin receptor also contains the CK and F3 domains characteristic of the class I cytokine receptor proteins (Fong et al., 1998). Sequence comparisons indicate a pattern of one CK-F3 combination, connected by a loop to the second CK-F3 domains and a further two F3 domains, similar to the human configuration (Fong et al., 1998). It has been shown that signaling is achieved by the second CK-F3 combination in the human receptor (Fong et al., 1998), and the amino acid sequence indicates this may also be possible in the pig.

As noted above, the presence in the pig of an intracellular domain of 304 amino acids represents homology with the long isoform of the receptor in other species. In further support of this view is the presence of conserved regions of intracellular sequences of cytokine receptors known as box 1 and box 2 (Murakami et al., 1991). Box 1 of the pig leptin receptor (a.a. 869-877) is hydrophobic, has four of eight residues present in gp130, including two prolines and, thus, resembles other receptors of this cytokine 1 receptor family (Murakami et al., 1991) as well as the mouse leptin receptor (Ghilardi et al., 1996). It is found at the same site relative to the transmembrane domain as is box 1 in several cytokine receptors (Murakami et al., 1991). The pig box 2 sequence has seven of eight residues identical to box 2 of the human leptin receptor. These sequences are believed to be binding domains for the Janus kinases (JAKs) of the cytokine intracellular signaling pathway (Ihle et al., 1995).

Tissue distribution of mRNA Lept-r

Expression of leptin receptor was demonstrated by Northern analysis in the kidney, liver, spleen, lung and brain as well as in the testis, uterus, ovary, CL, theca and granulosa cells. Thus, key reproductive tissues in both male and female pig express the leptin receptor and, therefore, may be target tissues for leptin. This distribution is consistent with findings in other species, where leptin receptor expression is present in rat (Zamorano et al., 1997) and human (Cioffi et al., 1997; Cioffi et al., 1996; Karlsson et al., 1997) gonads.

Leptin receptor isoforms in the pig ovary

In other species, transcripts encoding leptin receptor isoforms are generated by alternative splicing and result in the expression of receptors with short or long intracellular domains (Tartaglia et al., 1997; Tartaglia et al., 1995). To date six isoforms have been identified in mammals (Lollmann et al., 1997). The long forms dimerize and interact with JAKs, and are believed responsible for most of the biological effects of leptin known to date (Bjorbaek et al., 1997). Recent studies suggest that short forms may modulate the activity of the long isoform, act as transport proteins for leptin (Banks et al., 1996) and/or may have some signaling capacity through MAP kinase, independent of the JAK system (Murakami et al., 1997; Uotani et al., 1999). There is also an isoform lacking the membrane-spanning domain found in the mouse, the so-called soluble form (Gavrilova et al., 1997; Tartaglia et al., 1997).

Both human (Karlsson et al., 1997) and mouse (Lee et al., 1996) ovaries display long and short isoforms of the leptin receptor. Thus, it was of interest to examine findings in the pig ovary to establish the potential for the presence of isoforms. The predicted molecular weight of the long form of the leptin receptor is on the order of 130 kDa. To this estimate must be added the effects of glycosylation; for example, the glycosylated human

extracellular domain alone migrates at 145 kDa (Haniu et al., 1998). In other investigations, Western blots of the mouse leptin receptor indicate the presence of multiple forms, some which migrate in excess of 200 kDa (Ghilardi and Skoda, 1997, Bjorbaek et al., 1997). Using the same antibody, we have found mouse forms that migrate at approximately 175, 130, 100 and 80 kDa and pig luteal forms at 175, 100 and 80 kDa. The 175 kDa form in the pig ovary, which is of sufficient size to be the long form of the receptor, was present in greatest abundance corresponding to the mid-luteal phase of the pig estrous cycle, and increased in granulosa cells as they luteinized *in vitro*, correlating well, in both models, with the abundance of the 4.4 kb mRNA. It is not clear what more rapidly migrating forms represent. They may be shorter isoforms of the receptor as found in the mouse at 150 and 116 kDa (Ghilardi and Skoda., 1997). The band of lowest molecular weight may consist of partially degraded receptors (Ghilardi and Skoda, 1997).

Leptin receptor and luteal function

In the present study, we demonstrate that pig leptin receptor transcripts and protein consistent with the full length receptor, increase in association with *in vivo* luteinization of the pig CL and decline coincidental to luteal regression. *In vitro*, leptin mRNA and protein expression increases at the time of morphological differentiation and logarithmic in progesterone accumulation over 96 h of culture (Pescador et al., 1999, Murphy and Dobias, 1999; Murphy, 2000). Thus, leptin receptor expression correlates with maximal progesterone production in both models, suggesting leptin has a positive effect on luteal function. The pig CL is comprised of cells of theca, granulosa, vascular and reticuloendothelial parentage. The methods employed in the present study

do not provide information relative to the cell types that express the leptin receptor. Nevertheless, it is known that leptin induces angiogenesis (Bouloumie et al., 1998), and this may be reflected in the correlation between luteinization and leptin receptor expression in the porcine ovary. We have preliminary information to indicate that recombinant human leptin induces phosphorylation of STAT proteins pig granulosa cells *in vitro* (Ruiz-Cortés and Murphy, unpublished). This indicates that the porcine leptin receptor is functional, and that leptin may exert direct effects on the porcine ovary. In other species, both positive and negative effects have been demonstrated. On the positive side, treatment of the *ob/ob* mouse with recombinant leptin was found to markedly upregulate cytochrome P450-side chain cleavage and P450-17 α hydroxylase mRNA levels in the ovary (Zamorano et al., 1997). Similarly, studies in human luteinized granulosa cells indicated that leptin stimulates estrogen production by increasing the P450 aromatase mRNA and protein expression and, consequently, aromatase activity (Kitawaki et al., 1999).

Nonetheless, most reports suggest that leptin has inhibitory effects on ovarian steroidogenesis. Interference with estradiol synthesis was demonstrated in both rat (Zachow et al., 1999) and cow (Spicer and Francisco, 1997) granulosa cells *in vitro*. The effects on granulosa cells appear to result from interference with growth factor (Agarwal et al., 1999; Spicer and Francisco, 1997; Zachow et al., 1999), glucocorticoid (Barkan et al., 1999) and/or insulin (Agarwal et al., 1999) interactions with stimulatory ligands. The inhibitory effects of leptin on theca cells comprise direct interference with ligand-induced steroidogenesis (Spicer and Francisco, 1998). The mechanisms of leptin inhibition of steroid synthesis are not well known, although there is evidence for interference with adrenodoxin activity in ovarian cells (Barkan et al., 1999). Transcriptional

inhibition by leptin has been evoked by demonstration of reduction in transcripts for steroidogenic enzymes in adrenal cortical cells (Zamorano et al., 1997), and abolition of glucocorticoid induced transcription in granulosa cells (Barkan et al., 1999). Similarly, incubation of rat Leydig cells with increasing concentrations of leptin (2-500ng/ml) led to a significant and dose-dependent inhibition of hCG-stimulated testosterone production (Caprio et al., 1999). This was accompanied by a significant reduction of androstenedione and a concomitant rise of the precursor metabolites pregnenolone, progesterone, and 17-OH-progesterone, consistent with a leptin-induced lesion in 17,20 lyase activity.

It is difficult to reconcile the positive correlation between the occurrence of the leptin receptor and luteal function *in vivo* and *in vitro* reported herein with the preponderance of evidence for leptin inhibition of steroidogenesis. It remains possible that leptin exerts an inhibitory effect on the P450 aromatase expression and estradiol synthesis known to occur during luteinization *in vitro* (Pescador et al., 1999). Determination of the role of leptin in granulosa cell differentiation or on luteal function *in vivo* requires further experimentation.

In summary, the porcine leptin receptor domains are conserved relative to the human, rat and mouse sequences, and leptin receptor mRNA is widely distributed in porcine tissues, with strong expression in reproductive organs including the uterus, whole ovary, granulosa cells and corpora lutea. In granulosa cells and corpus luteum, the leptin receptor mRNA and protein levels are correlated with functional differentiation and luteinization. Given the ample evidence for effects of leptin on theca and granulosa cells in other species, these findings suggest a direct effect of leptin on the porcine ovary.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Research Grant STR0202133 from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. The invaluable technical assistance of Mira Dobias is gratefully acknowledged. We thank Dr. Nico Ghilardi for anti-mouse leptin receptor antibody, and Dr. Gil Schultz for the 28 S probe. T. Ruiz-Cortés is on leave from Universidad de Antioquia, Colombia.

REFERENCES

- Agarwal SK**, Vogel K, Weitsman SR, Magoffin DA. 1999. Leptin antagonizes the insulin-like growth factor-I augmentation of steroidogenesis in granulosa and theca cells of the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 84:1072-1076.
- Akins E**, Morrisette M. 1968. Gross ovarian changes during estrous cycle of swine. *Am J Vet Res* 29:1953-1957.
- Auwerx J**, Staels B. 1998. Leptin. *Lancet* 351:737-742.
- Banks W A**, Kastin AJ, Huang W, Jaspan JB, Maness LM. 1996. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* 17:305-311.
- Barash IA**, Cheung CC, Weigle DS, Ren H, Kabigting EB, Kuijper JL, **Clifton DK**, Steiner RA. 1996. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology* 137:3144-3147.
- Barb CR**, Yan X, Azain MJ, Kraeling RR, Rampacek GB, Ramsay TG. 1998. Recombinant porcine leptin reduces feed intake and stimulates growth hormone secretion in swine. *Domest Anim Endocrinol* 15:77-86.
- Barkan D**, Jia H, Dantes A, Vardimon L, Amsterdam A, Rubinstein M. 1999. Leptin modulates the glucocorticoid-induced ovarian steroidogenesis. *Endocrinology* 140:1731-1738.

- Bennett BD**, Solar GP, Yuan JQ, Mathias J, Thomas GR, Matthews W. 1996. A role for leptin and its cognate receptor in hematopoiesis. *Curr Biol* 6:1170-1180.
- Bidwell CA**, Ji S, Frank GR, Cornelius SG, Willis GM, Spurlock ME. 1997. Cloning and expression of the porcine obese gene. *Anim Biotech* 8:191-206.
- Bjorbaek C**, Uotani S, Da Silva B, Flier JS. 1997. Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem* 272:32686-32695.
- Bouloumie A**, Drexler HC, Lafontan M, Busse R. 1998. Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ Res* 83:1059-1066.
- Chedrese PJ**, The VL, Labrie F, Juorio AV, Murphy BD. 1990. Evidence for the regulation of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase messenger RNA by human chorionic gonadotrophin in luteinized porcine granulosa cells. *Endocrinology* 126:2228-2230.
- Caprio M**, Isidori AM, Carta AR, Moretti C, Dufau ML, and Fabbri A. 1999. Expression of functional leptin receptors in rodent leydig cells. *Endocrinology* 140:4939-4947.
- Chehab FF**, Lim ME, Lu R. 1996. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet* 12:318-320.
- Cioffi JA**, Van Blerkom J, Antczak M, Shafer A, Wittmer S, Snodgrass HR. 1997. The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles. *Mol Hum Reprod* 3:467-472.
- Cioffi JA**, Shafer AW, Zupancic TJ, Smith-Gbur J, Mikhail A, Platika D, Snodgrass HR. 1996. Novel B219/OB receptor isoforms: possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction. *Nat Med* 2:585-589.

Conway GS, Jacobs HS. 1997. Leptin: a hormone of reproduction [editorial]. *Hum Reprod* 12:633-635.

Dyer CJ, Simmons JM, Matteri RL, Keisler DH. 1997. Effects of an intravenous injection of NPY on leptin and NPY-Y1 receptor mRNA expression in ovine adipose tissue. *Domest Anim Endocrinol* 14:325-333.

Ernst CW, Kapke PA, Yerle M, Rothschild MF. 1997. The leptin receptor gene (LEPR) maps to porcine chromosome 6. *Mamm Genome* 8:226.

Fong TM, Huang RR, Tota MR, Mao C, Smith T, Varnerin J, Karpitskiy VV, Krause JE, Van der Ploeg LH. 1998. Localization of leptin binding domain in the leptin receptor. *Mol Pharmacol* 53:234-240.

Fruhbeck G, Jebb SA, Prentice AM. 1998. Leptin: physiology and pathophysiology. *Clin Physiol* 18:399-419.

Gavrilova O, Barr V, Marcus-Samuels B, Reitman M. 1997. Hyperleptinemia of pregnancy associated with the appearance of a circulating form of the leptin receptor. *J Biol Chem* 272:30546-30551.

Ghilardi N, Skoda RC. 1997. The leptin receptor activates janus kinase 2 and signals for proliferation in a factor-dependent cell line. *Mol Endocrinol* 11:393-399.

Ghilardi N, Ziegler S, Wiestner A, Stoffel R, Heim MH, Skoda RC. 1996. Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6231-6235.

Haniu M, Arakawa T, Bures EJ, Young Y, Hui JO, Rohde MF, Welcher AA, Horan T. 1998. Human leptin receptor. Determination of disulfide structure and N- glycosylation sites of the extracellular domain. *J Biol Chem* 273:28691-28699.

Ihle J N, Kerr IM. 1995. JAKS and STATS in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet* 11:69-74.

Karlsson C, Lindell K, Svensson E, Bergh C, Lind P, Billig H, Carlsson LM, Carlsson B. 1997. Expression of functional leptin receptors in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 82:4144-4148.

Kitawaki J, Kusuki I, Koshiba H, Tsukamoto K, Honjo H. 1999. Leptin directly stimulates aromatase activity in human luteinized granulosa cells. *Mol Hum Reprod* 5:708-713.

Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JJ, Friedman JM. 1996. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379:632-635.

Li XM, Juorio AV, Murphy BD. 1995. Angiotensin II interferes with steroidogenesis in porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 53:791-799.

Lollmann B, Gruninger S, Stricker-Krongrad A, Chiesi M. 1997. Detection and quantification of the leptin receptor splice variants Ob- Ra, b, and, e in different mouse tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 238:648-652.

Mao J, Zak LJ, Cosgrove JR, Shostak S, Foxcroft GR. 1999. Reproductive, metabolic, and endocrine responses to feed restriction and GnRH treatment in primiparous, lactating sows. *J Anim Sci* 77:724-735.

Mendiola J, Janzen M, Cruz M, Louis CF. 1997. Cloning and tissue distribution of the leptin mRNA in the pig. *Anim Biotech* 8:227-236.

Murakami M, Narazaki M, Hibi M, Yawata H, Yasukawa K, Hamaguchi M, Taga T, Kishimoto T. 1991. Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:11349-11353.

Murakami T, Yamashita T, Iida M, Kuwajima M, Shima K. 1997. A short form of leptin receptor performs signal transduction. *Biochem Biophys Res Commun* 231:26-29.

- Murphy BD**, and Dobias M. 1999. Homologous and heterologous ligands downregulate follicle-stimulating hormone receptor mRNA in porcine granulosa cells. *Mol Reprod Dev* 53:198-207.
- Murphy BD**. 2000. Models of luteinization. *Biol Reprod* (*in press*).
- Pescador N**, Stocco DM, Murphy BD. 1999. Growth factor modulation of steroidogenic acute regulatory protein and luteinization in the pig ovary. *Biol Reprod* 60:1453-1461.
- Pfister-Genskow M**, Hayes H, Eggen A, Bishop MD. 1997. The leptin receptor (LEPR) gene maps to bovine chromosome 3q33. *Mamm Genome* 8:227.
- Ramsay TG**, Yan X, Morrison C. 1998. The obesity gene in swine: sequence and expression of porcine leptin. *J Anim Sci* 76:484-490.
- Robert C**, Palin MF, Coulombe N, Roberge C, Silversides FG, Benkel BF, McKay RM, Pelletier G. 1998. Backfat thickness in pigs is positively associated with leptin mRNA levels. *Can J Anim. Sci.* 78:473-482.
- Spicer LJ**, Francisco CC. 1998. Adipose obese gene product, leptin, inhibits bovine ovarian thecal cell steroidogenesis. *Biol Reprod* 58:207-212.
- Spicer LJ**, Francisco CC. 1997. The adipose obese gene product, leptin: evidence of a direct inhibitory role in ovarian function. *Endocrinology* 138:3374-3379.
- Stratil A**, Kopecny M, Moser G, Schroffel J Jr, Cepica S. 1998. HpaII and RsaI PCR-RFLPs within an intron of the porcine leptin receptor gene (LEPTR) and its linkage mapping. *Anim Genet* 29:405-406.
- Takaya K**, Ogawa Y, Isse N, Okazaki T, Satoh N, Masuzaki H, Mori K, Tamura N, Hosoda K, Nakao K. 1996. Molecular cloning of rat leptin receptor isoform complementary DNAs: identification of a missense

mutation in Zucker fatty (fa/fa) rats. *Biochem Biophys Res Commun* 225:75-83.

Tartaglia LA. 1997. The leptin receptor. *J Biol Chem* 272:6093-6096.

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J. 1995. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83:1263-1271.

Uotani S, Bjorbaek C, Tornoe J, Flier JS. 1999. Functional properties of leptin receptor isoforms: internalization and degradation of leptin and ligand-induced receptor downregulation. *Diabetes* 48:279-286.

Zachow RJ, Weitsman SR, Magoffin DA. 1999. Leptin impairs the synergistic stimulation by transforming growth factor- β of follicle-stimulating hormone-dependent aromatase activity and messenger ribonucleic acid expression in rat ovarian granulosa cells. *Biol Reprod* 61:1104-1109.

Zamorano PL, Mahesh VB, De Sevilla LM, Chorch LP, Bhat GK, Brann DW. 1997. Expression and localization of the leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissues of the rat. *Neuroendocrinology* 65:223-228.

Zhang Y, Olbort M, Schwarzer K, Nuesslein-Hildesheim B, Nicolson M, Murphy E, Kowalski TJ, Schmidt I, Leibel RL. 1997. The leptin receptor mediates apparent autocrine regulation of leptin gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 240:492-495.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432.

Primer name ^a	Primer sequence ^b	Primer position ^c	Product size (bp) ^d
plept-r A (F)	5'-ATTTATGTGATAACTGC-3'	238-255	
plept-r 1 (R)	5'-GAACTTTAAGGTCATAATTCTT-3'	674-654	444
plept-r B (F)	5'-GATGCAGTGTACTGCTGC-3'	1417-1435	
plept-r 2 (R)	5'-CTGCTCCTATGATACCTC-3'	1605-1588	188
plept-r C (F)	5'-TCAGAAGGATTGGATGAAC-3'	3359-3377	
plept-r 3 (R)	5'-CTCTCTTTTGTGATTGAGGTG-3'	3464-3445	108
plept-r D (F)	5'-AAGATATCAGTGTGATACAT-3'	2955-2975	
Dt (18) ad.(R)	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'		1300
plept-r E (F)	5'-TTCTCTGAAGTAAGATG-3'	179-196	
plept-r 2 (R)	5'-CTGCTCCTATGATACCTC-3'	1605-1588	1330
plept-r B (F)	5'-GATGCAGTGTACTGCTGC-3'	1417-1435	
plept-r 4 (R)	5'-CTCAGCCTCAGAGAAGT-3'	3101-3087	1690

Table I. Oligonucleotides primers used in RT-PCR to generate amplicons of pig leptin receptor (Lept-r) used for sequencing

^a F and R refer to forward and reverse primers, respectively

^b All primers had an EcoRI restriction site sequence

^c References to human leptin receptor sequence, accession number in Genbank is U43168

^d bp, base pairs

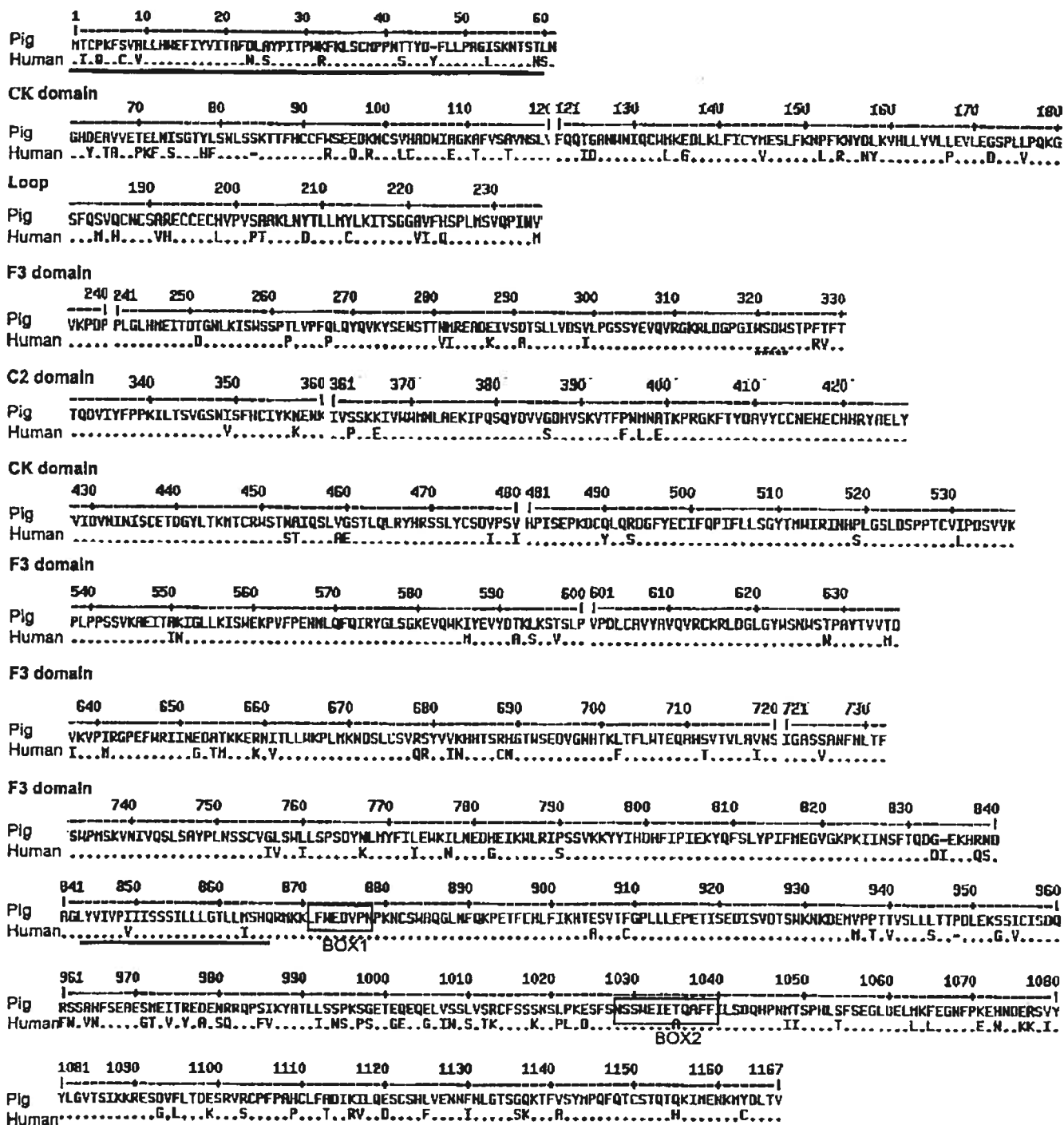


Figure 1. Domain structure of the pig leptin receptor based on alignment of its deduced amino acid sequence with that of the human receptor. The human amino acid residue is indicated where sequences differ. The CK, F3 and C2 domains common to the cytokine receptor family are present in the pig sequence. The putative signal sequence (residues 1-59) and the transmembrane domain (residues 840-866) are underlined. The Trp-Ser-X-Trp-Ser motif (residues m 320-325) common to cytokine receptors is indicated by asterisks. The conserved cytokine box 1 and box 2 sequences are indicated.

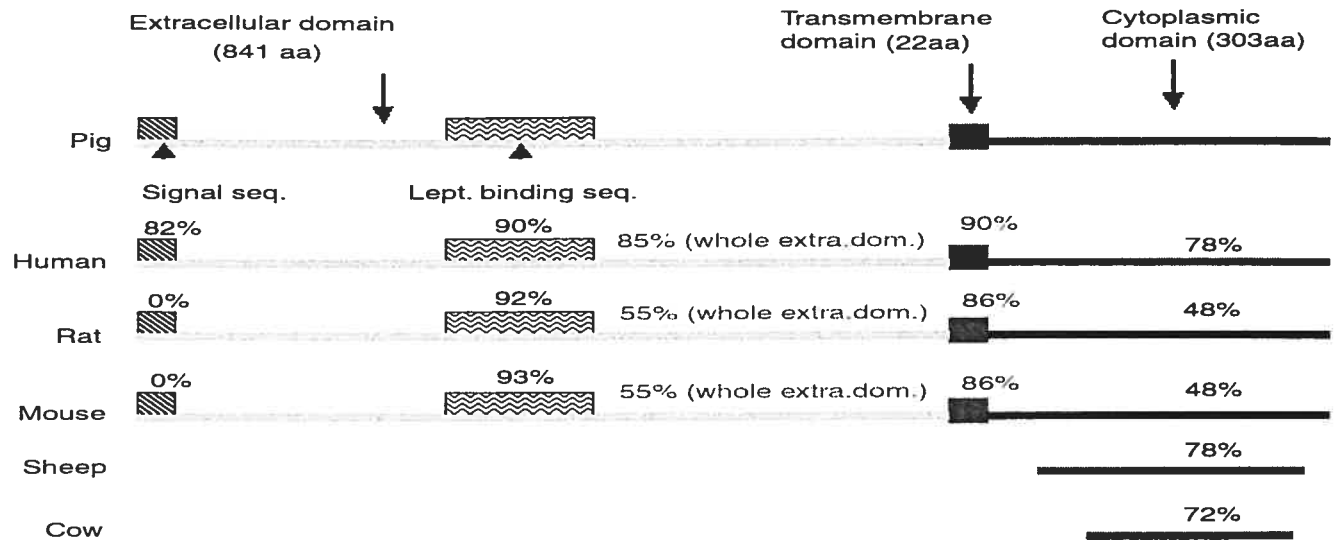


Figure 2. Homology of the porcine leptin receptor with complete and partial sequences in other mammalian species

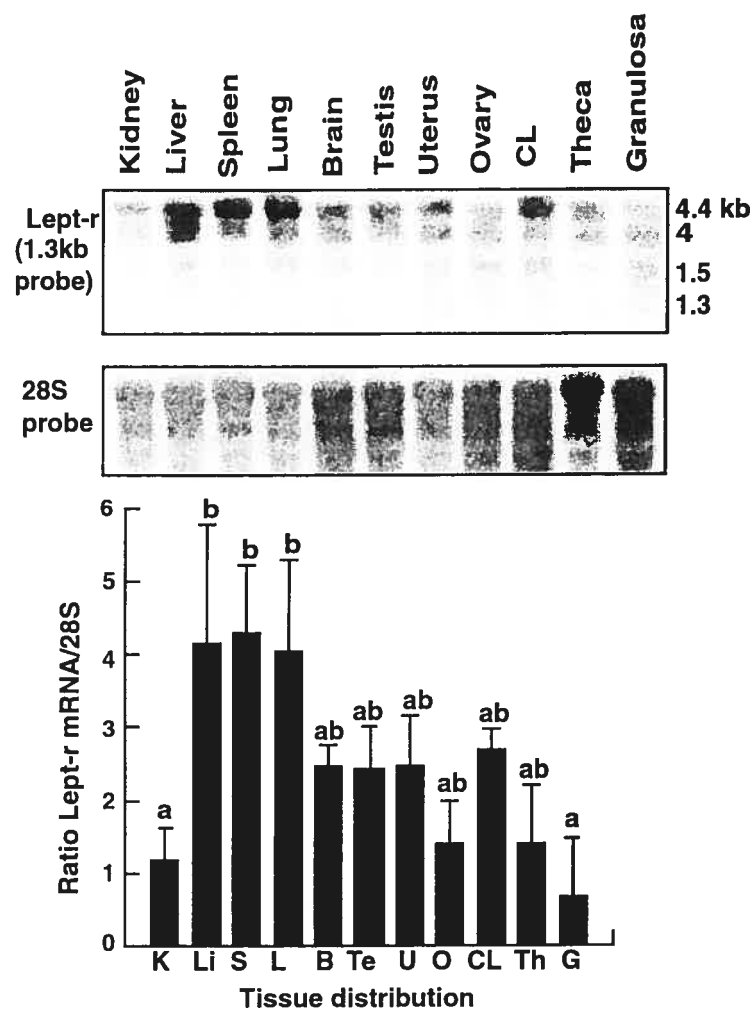
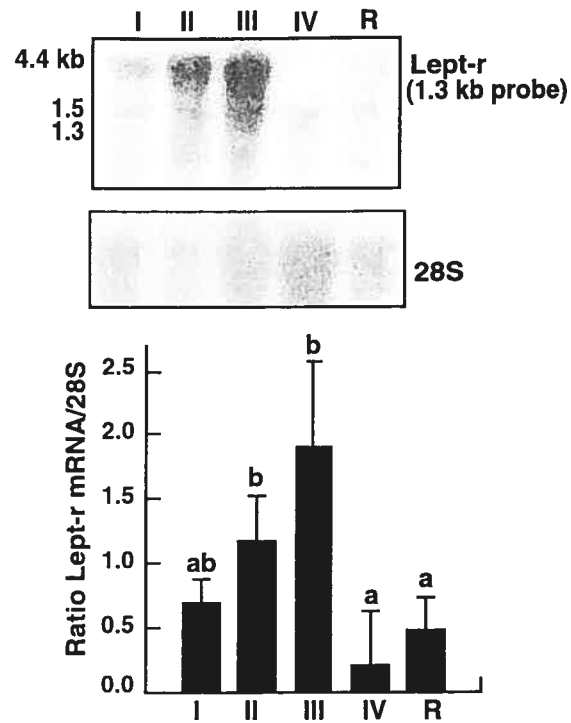


Figure 3. Northern analysis demonstrating the distribution of leptin receptor transcripts as revealed by hybridization with a 1.3 Kb probe. The blot was rehybridized with the human 28S probe to indicate consistency of RNA loading and transfer. The lower panel is the mean (\pm SEM) of the dimensionless ratio of the densitometric scan of the predominant 4.4 Kb band and the 28S band from three separate analyses of different tissues acquired from the abattoir. Superscripts denote mean differences at $p < 0.05$.

A.



B.

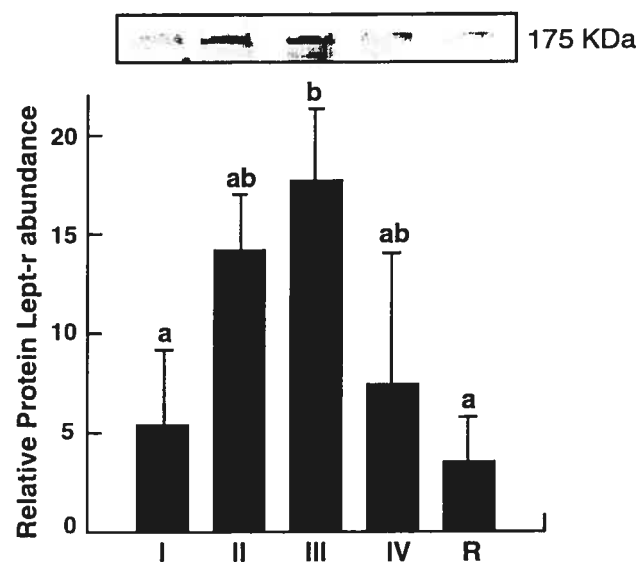
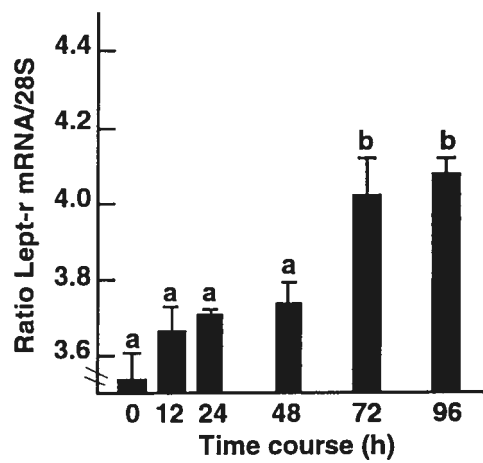
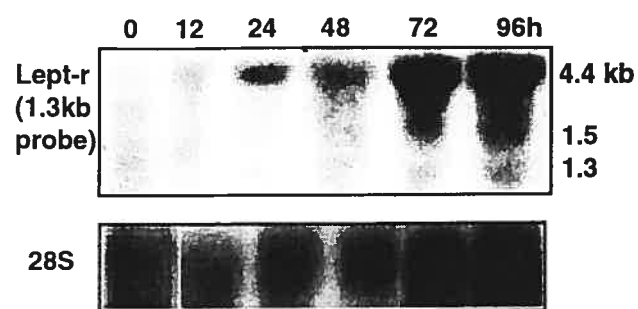


Figure 4. A. Northern analysis demonstrating the relative abundance of leptin receptor mRNA in porcine corpora lutea through the estrous cycle. Stage I represents the postovulatory CL, II and II are the mid luteal phase, IV is early regression and R represents the regressed CL. The lower panel is the mean (\pm SEM) of the dimensionless ratio of the densitometric scan of the predominant 4.4 Kb band and the 28S band from three separate analyses of CL acquired on different days from the abattoir. Superscripts denote mean differences at $p < 0.05$. **B.** Immunoblot of proteins from corpora lutea through the estrous cycle. Stage I represents the postovulatory CL, II and II are the mid luteal phase, IV is early regression and R represents the regressed CL. A mouse antibody against the extracellular domain of the mouse leptin receptor was employed. The lower panel depicts mean (\pm SEM) of densitometric scans of the band migrating at approximately 175 Kda from three independently acquired sets of corpora lutea.

A.



B.

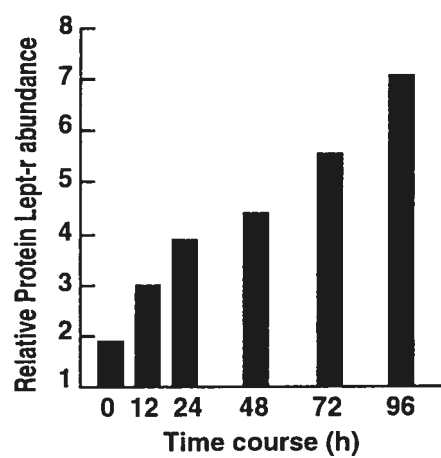


Figure 5. A. Pattern of abundance of leptin receptor transcripts during in vitro luteinization of porcine granulosa cells. In the lower panel, the mean (\pm SEM) of the dimensionless ratio between the 4.4 Kb leptin transcript and 28S is presented, and superscripts denote statistically definable differences at $p < 0.05$. **B.** Immunoblot of proteins from porcine granulosa cells during in vitro luteinization. The relative abundance of the band migrating at approximately 175 Kda is graphically represented below the blot. This figure is representative of three independent analyses.

En résumé, dans le chapitre II a été démontré que les différents domaines de la séquence du récepteur de leptine porcine sont conservés parmi d'autres espèces (humain, souris, rats). Les ARN messagers sont amplement distribués dans les tissus porcins avec une forte expression dans le système reproducteur inclus l'utérus, l'ovaire, les cellules de granulosa et le corps jaune. Dans ces deux derniers, les niveaux des messagers et de la protéine du récepteur de leptine sont en corrélation avec la différenciation fonctionnelle et la lutéinisation. Ceci suggère un effet direct de la leptine sur l'ovaire porcine.

Pour prouver et vérifier la fonctionnalité de ces récepteurs, des expériences in vitro avec des cellules de granulosa sont nécessaires. La purification de la leptine porcine permet de traiter ces cellules et d'étudier les possibles voies de signalisation interne ainsi que les effets de la leptine une fois le récepteur est activé. Des gènes susceptibles d'être régulés en aval de cette activation sont aussi étudiés grâce à ce modèle.

CHAPITRE III

Biphasic effects of leptin in porcine granulosa cells¹

**Z. Tatiana Ruiz-Cortés², Yan Martel-Kennes³, Nicolas Y. Gévry²,
Bruce R. Downey⁴, Marie-France Palin³ and Bruce D. Murphy^{2,5}**

2 Université de Montréal, Centre de recherche en reproduction animale, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada J2S7C6; 3 Dairy and Swine Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, Lennoxville, Quebec, Canada, J1M 1Z3; 4 Animal Science, McGill University, Ste-Anne-de-Bellevue, Québec, Canada, H9X 3V9

Key words: Leptin, ovary, signaling, sterol regulatory element binding protein, granulosa cells.

1 Supported by grant STR0202133 from The Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. Z.T. Ruiz-Cortés is on leave from Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

5 Corresponding author, Fax: 450 778 8103, e-mail

Biphasic Effects of Leptin in Porcine Granulosa Cells¹

Z. Tatiana Ruiz-Cortés,³ Yan Martel-Kennes,⁴ Nicolas Y. Gévry,³ Bruce R. Downey,⁵ Marie-France Palin,⁴ and Bruce D. Murphy^{2,3}

Université de Montréal,³ Centre de recherche en reproduction animale, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6
Dairy and Swine Research and Development Centre,⁴ Agriculture and Agri-Food Canada, Lennoxville,
Quebec, Canada J1M 1Z3
Department of Animal Science,⁵ McGill University, Ste-Anne-de-Bellevue, Québec, Canada H9X 3V9

ABSTRACT

The direct effects of recombinant porcine leptin on porcine granulosa cells were studied to test the hypothesis that leptin, acting through the nuclear transcription factor signal transducer and activator of transcription 3 (STAT-3), modulates sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1) thereby increasing steroidogenesis. In porcine granulosa cells in culture over 48 h, leptin at 10 ng/ml increased progesterone accumulation 3-fold while it was reduced by leptin at 1000 ng/ml. Leptin had no effect on progression of granulosa cells through the cell cycle nor on the frequency of cell death. Leptin treatment at 24 or 48 h of culture resulted in dose-dependent 2- to 4-fold increases in tyrosine phosphorylation of STAT-3. Leptin had a biphasic effect on the abundance of membrane-bound and transcriptionally active forms of SREBP1. In transient transfection of primary porcine granulosa cells, the plasmid expressing the transcriptionally active form of SREBP-1 induced transcription of the key regulator of steroidogenesis, the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). StAR transcription was also increased by the low dose of leptin and was further upregulated in the presence of the SREBP plasmid. Leptin at 1000 ng/ml inhibited SREBP1-induced StAR expression. Thus, leptin, acting through STAT-3, modulates steroidogenesis in a biphasic and dose-dependent manner, and SREBP1 induction of StAR expression may be in the cascade of regulatory events.

corpus luteum, leptin, leptin receptor, progesterone, steroid hormones

INTRODUCTION

The peptide leptin is produced primarily by adipocytes and achieves hormonal status by virtue of its secretion into the bloodstream [1]. Its role in reproduction includes important actions on the hypothalamus to bring about release of LH-releasing hormone, thereby triggering gonadotropin release and leading to development of the reproductive tract and induction of puberty [1]. Administration of leptin to obese leptin-deficient mutant mice caused decreased food intake, body weight loss, increased ovarian weight, increase in ovarian follicles, and restoration of fertility [2–4]. A direct involvement of leptin in ovarian function has been pos-

tulated. The expression of leptin receptors has been demonstrated in human, mouse, rat, and pig ovaries [4–7]. Given its positive effects on gonadotropin secretion and fertility, leptin is expected to have either a positive local effect or no effect at all. The majority of researchers have suggested that the direct effects of leptin on ovarian cells are inhibitory and can be attributed to attenuation of gonadotropin, insulin, insulin-like growth factor 1 (IGF-I), and/or glucocorticoid-mediated steroidogenesis [6, 8–14]. Contrasting studies have revealed direct stimulatory effects of leptin in rat and human ovaries in the form of induction of cytochrome P450aromatase and consequent estrogen synthesis [15].

Alternative splicing of the leptin receptor results in the production of multiple isoforms that contain a common extracellular domain [16, 17] and cytoplasmic domains of differing lengths. The longest form of the leptin receptor, form b, is a member of the interleukin (IL) 6 receptor family of class I cytokine receptors [18, 19] and is the only isoform that contains intracellular tyrosine residues that can serve as a target for phosphorylation [18]. This receptor isoform is highly expressed in the porcine ovary, and its cytoplasmic domain contains the potential Janus kinase (JAK) binding domains and the potential consensus sequence for binding of signal transducers and activators of transcription (STAT) [7, 19].

Steroidogenesis depends on the supply of its precursor, cholesterol, derived from intracellular and extracellular sources. Intracellular levels are tightly controlled by regulation of the uptake, storage, and synthesis by a unique family of transcription factors known as the sterol regulatory element-binding proteins (SREBP) [20]. These transcription factors are localized to the endoplasmic reticulum in an approximately 125-kDa precursor form under conditions of replete intracellular sterol/cholesterol stores. Upon depletion of cholesterol, the membrane-bound proteins are cleaved by proteases, releasing a 68-kDa transcription regulator. The mature SREBPs enter the nucleus, where they bind sterol regulatory sites located in the promoter regions of genes involved in cholesterol homeostasis and transport [21]. Circulating leptin has an effect on the gene expression profile and phenotype of white adipose tissue. In this context, leptin modulates SREBP1 activity by decreasing the amount of mRNA and of cleaved (transcriptionally active) SREBP1 protein [22].

Little is known about the genes targeted by leptin in the ovary, other than the apparent activation of c-jun and the inhibition of serum glucocorticoid kinase [23]. Given the known influences of leptin on steroid synthesis, the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) is an interesting candidate for leptin regulation, especially since SREBP1

¹This work was supported by grant STR0202133 from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. Z.T.R.-C. is on leave from Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

²Correspondence. FAX: 450 778 8103;
e-mail: [REDACTED]

Received: 27 August 2002.

First decision: 3 September 2002.

Accepted: 10 September 2002.

© 2003 by the Society for the Study of Reproduction, Inc.
ISSN: 0006-3363. <http://www.biolreprod.org>

RÉSUMÉ

Les effets directs de la leptine recombinante porcine dans les cellules de granulosa porcine ont été étudiés en fonction de l'hypothèse suivante : par l'intermédiaire du signal transducteur et activateur de la transcription-3 (STAT-3), la leptine assurerait la régulation des protéines fixatrices des éléments régulateurs du stérol-1 (SREBP-1) et contribuerait donc à stimuler la stéroïdogénèse. Dans les cellules de granulosa en culture pendant 48 h, la leptine à raison de 10 ng/ml provoque une augmentation par un facteur de trois l'accumulation de progestérone (P4) alors qu'une dose de 1000 ng/ml, au contraire, la réduit. La leptine n'a pas d'effet sur la progression du cycle cellulaire et sur la mortalité dans les cellules de granulosa. Le résultat d'un traitement à la leptine chez des cellules soumises par la suite à 24 h ou 48 h de culture est une augmentation dose-dépendante par un facteur de deux à quatre de la protéine STAT-3. La leptine a un effet biphasique sur l'expression de la forme active des protéines SREBP-1. Lors de la transfection des cellules primaires de granulosa porcine, le plasmide qui exprime la forme active de la SREBP-1 induit la transcription de la protéine de régulation rapide de la stéroïdogénèse (StAR). La transcription de la StAR est aussi stimulée par de faibles doses de leptine et encore plus par la présence du plasmide contenant la SREBP-1. La leptine administrée à raison de 1000 ng/ml inhibe la stimulation par la SREBP de l'expression de la StAR. En conclusion, la leptine assure la régulation de la stéroïdogénèse d'une manière biphasique et dose-dépendante par la voie des STAT-3 et l'induction de l'expression des StAR par les SREBP-1 ferait partie des événements de la cascade intracellulaire déclenchée par la leptine dans les cellules ovariennes chez le porc.

ABSTRACT

The direct effects of recombinant porcine leptin on porcine granulosa cells were studied, based on the hypothesis that leptin, acting through the nuclear transcription factor, STAT-3, modulates sterol regulatory element binding protein 1 (SREBP1), thereby increasing steroidogenesis. In porcine granulosa cells in culture over 48 h, leptin at 10 ng/ml increased progesterone accumulation three fold, and while it was reduced by leptin at 1000 ng/ml. Leptin had no effect on progression of granulosa cells through the cell cycle nor on the frequency of cell death. Leptin treatment at 24 or 48 h of culture resulted in dose-dependent, 2-4 fold increases in tyrosine phosphorylation of STAT-3. Leptin had a biphasic effect on the abundance of membrane bound and transcriptionally active forms of SREBP1. In transient transfection of primary pig granulosa cells, the plasmid expressing the transcriptionally active form of SREBP1 induced transcription of the key regulator of steroidogenesis, the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). StAR transcription was also increased by the low dose of leptin and further upregulated in the presence of the SREBP plasmid. Leptin at 1000 ng/ml inhibited SREBP1-induced StAR expression. Thus, leptin, acting through STAT-3, modulates steroidogenesis in a biphasic and dose-dependent manner, and SREBP1 induction of STAR expression may be in the cascade of regulatory events.

INTRODUCTION

Leptin is a peptide produced primarily by adipocytes, and achieves hormonal status by virtue of its secretion into the bloodstream [1]. Its role in reproduction includes important actions on the hypothalamus to bring about release of luteinizing hormone (LH)-releasing hormone, thereby

triggering gonadotropin release and leading to development of the reproductive tract and induction of puberty [1].

Administration of leptin to obese, leptin-deficient mutant mice caused decreased food intake, body weight loss, increased ovarian weight, an increase in ovarian follicles, and restoration of fertility [2-4]. A direct involvement of leptin in ovarian function has been postulated. Indeed, the expression of leptin receptors has been shown in human, mouse, rat and pig ovaries [4-7].

Given the positive effects on gonadotropin secretion and fertility, leptin is expected to have either a positive local effect, or no effect at all. To date, the majority of investigations suggest that the direct effects of leptin on ovarian cells are inhibitory, and attributed to attenuation of gonadotropin, insulin, insulin-like growth factor-1 (IGF-I) and/or glucocorticoid mediated steroidogenesis [6, 8-14].

Contrasting studies have demonstrated direct stimulatory effects of leptin in rat and human ovaries in the form of induction of cytochrome P450aromatase and consequent estrogen synthesis [15].

Alternative splicing of the leptin receptor results in the production of multiple isoforms that contain a common extra-cellular domain [16, 17] and cytoplasmic domains of differing lengths. The longest form of the leptin receptor, form b, is a member of the interleukin (IL)-6 receptor family of class I cytokine receptors [18, 19] and is the only isoform that contains intracellular tyrosine residues that can serve as a target for phosphorylation [18]. This receptor isoform is highly expressed in the porcine ovary, and its cytoplasmic domain contains the potential Janus kinase (JAK) binding domains and the potential consensus sequence for binding of signal transducers and activators of transcription (STAT) [7, 19].

Steroidogenesis depends on the supply of its precursor, cholesterol, derived from intracellular and extracellular sources. Intracellular levels are tightly controlled by regulation of the uptake, storage and synthesis by a unique family of transcription factors known as the sterol regulatory element-binding proteins (SREBP) [20]. These transcription factors are found localized to the endoplasmic reticulum in an approximately 125-kDa precursor form under conditions of replete intracellular sterol/cholesterol stores. Upon depletion of cholesterol, the membrane-bound proteins are cleaved by proteases, releasing a 68-kDa transcription regulator. The mature SREBPs enter the nucleus where they bind sterol regulatory (SRE) sites located in the promoter regions of genes involved in cholesterol homeostasis and transport [21]. Circulating leptin has an effect on the gene expression profile and phenotype of white adipose tissue. In this context, leptin was recently shown to modulate SREBP-1 activity by decreasing both the amount of mRNA and cleaved (transcriptionally active) SREBP-1 protein [22].

Little is known about the genes targeted by leptin in the ovary, other than the apparent activation of c-jun and the inhibition of serum glucocorticoid kinase [23]. Given the known influences of leptin on steroid synthesis, the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) is an interesting candidate for leptin regulation. It was recently demonstrated that SREBP-1 regulates steroidogenic acute regulatory protein (StAR) [24].

To gain further insight into the mechanisms of action of leptin in the ovary, we investigated the effects of leptin on porcine granulosa cells *in vitro*. We present data demonstrating that leptin, acting through STAT-3, modulates steroidogenesis in a biphasic, dose dependent manner, and that SREBP-1 induction of StAR expression may be in the cascade of regulatory events.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Granulosa cells were aspirated from medium-sized (3-5 mm) follicles of ovaries from prepubertal gilts and cultured as previously described [25]. Briefly, $7-9 \times 10^6$ viable cells/ml were pooled in minimum essential medium (MEM, Gibco BRL, Burlington, ON) containing 1 mg/l insulin (Sigma, Oakville, ON), 0.1 mM non-essential amino acids (Gibco BRL), 5×10^4 UI/l penicillin (Gibco BRL), 50 μ g/l streptomycin (Gibco BRL), 0.5 mg/l fungizone (Gibco BRL), and 10% fetal calf serum (Gibco BRL). Incubation was carried at 37 °C. To evaluate the effects of leptin on progesterone production and abundance of signaling molecule SREBP-1, cells were incubated with 0, 10, 100 or 1000 ng/ml of recombinant porcine leptin for 12, 24 and 48h. Phosphorylated STAT-3 abundance was evaluated after treatment of porcine granulosa cells with the same leptin doses for 5, 15 or 30 min at various times (12, 24 and 48 h) after initiation of cultures. To characterize the interactions among leptin, FSH and IGF-I and progesterone production, cells were incubated with porcine pituitary FSH (100 ng/ml; Sigma) alone or in combination with human recombinant IGF-I (100 ng/ml; Sigma) and/or leptin (10 or 1000 ng/ml). To provide sufficient protein for Western analysis, cells from three wells per treatment at 12, 24 and 48 h were pooled. Similarly, pooled samples of medium were collected for radioimmunoassay of progesterone. There were three independent replicates of each experiment in which the cell populations were derived from ovaries collected at the abattoir on different days.

Determination of granulosa cell viability

To evaluate the role of leptin on granulosa cell proliferation and /or viability, cells were cultured as described above for 12, 24 and 48 h with

varying doses of leptin. Cells from three independent granulosa cell cultures were subjected to flow cytometric analysis. Cultures were dispersed by treatment with 1% trypsin (Sigma) and collected by centrifugation at 1000 rpm for 10 min. The cell pellets were resuspended in 200 μ l PBS and 5 ml of ice-cold 70 % ethanol was added, drop-wise, under agitation, to the cell suspension, which was maintained at 4 °C. The cells were collected by centrifugation (1000 rpm/5 min); the cell pellets were washed twice with PBS, and resuspended in 500 μ l PBS. Then, 100 μ l of propidium iodide (Sigma; 1mg/ml) was added to label nuclei, followed by 10^{-2} μ l of deoxyribonuclease-free ribonuclease (RNAase) A (Sigma; 10 mg/ml). The cell suspension was protected against light, incubated for 1 h on ice, and then analyzed with a FACScan flow cytometer (Beckman Coulter, Mississauga, ON). The relative percentage of cells in each stage of cell cycle was then analyzed using ModFitLT V2.0 DNA analysis program (Becton Dickinson, San Jose, CA). Total proteins were extracted from porcine granulosa cells by addition of 400 μ l of 1M NaOH per well (7.5 mm plates) for 2 h at room temperature and then 400 μ l of 1M HCL for 1 h at 37°C. Total protein extracted from three independent granulosa cell experiments was assessed by the Bradford (Bio-Rad) protein assay.

Recombinant porcine leptin production and purification

In preliminary experiments, recombinant human leptin (BIOMOL, Plymouth Meeting, PA) was shown to alter steroidogenesis in porcine granulosa cells. On the basis of these positive results, we undertook the production of recombinant porcine leptin. The cDNA encoding for the mature porcine leptin protein (amino acids 22 to 167) was amplified by polymerase chain reaction from the complete leptin coding sequence that was previously subcloned in plasmid pBluescript KSII+ [26] (GenBank accession number AF026976). The forward primer, 5'-

GGTGGCATATGGTGCCCATCTGGAGAGTCC-3', contains an *NdeI* site, and the reverse primer, 5'CCGGAATTCAGCAGCCAGGGCTGAGG-3', contains an *EcoRI* site. The PCR mixture (50 µl) contained 1X Expand HF buffer (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN), 1 ng plasmid DNA, 0.2 mM of each dNTP, 2.6 units of Expand HF PCR System enzyme mix (Roche Diagnostics) and 30 pmol of each primer. The PCR amplification profile comprised 2 min at 94° C followed by 10 cycles of 15 sec at 94° C, 30 sec at 62° C and 2 min at 68° C followed by 28 cycles of 15 sec at 94° C, 30 sec at 62° C and 2 min at 68° C with a 5 sec time increment/cycle, and a final 5 min extension at 72° C. The amplified PCR products were then double digested with *NdeI* and *EcoRI* and were directly ligated to *NdeI-EcoRI*-double digested pTYB12 plasmid (IMPACT™-CN system, New England Biolab, Inc., Beverly, MA) to yield the pTYB12lep plasmid. Restriction digestion and DNA sequencing verified insertion of leptin cDNA. The pTYB12lep plasmid was used to transform *Escherichia coli* strain ER2566 and incubated at 37°C in LB medium supplemented with 100 µg/ml ampicillin. Cultures were grown to mid log (optical density OD₆₀₀ of 0.6-0.8) and expression induced with 0.5 mM isopropyl-D-thiogalactoside (IPTG), after which they were further incubated at 15 °C for 16 hours. Cells were harvested by centrifugation at 5000 g for 10 min. and the pellet resuspended in lysis buffer (20 mM HEPES (pH 8.0), 500 mM NaCl, 1mM EDTA, 0.1% Triton X-100). Cells were then disrupted by two X 2 min sequences of pulse sonication. The supernatant was separated from cell debris by centrifugation at 12 000 g for 30 min and passed through a chitin bead column (5 x 2 cm) previously equilibrated with buffer A (20 mM HEPES (pH 8.0), 1 M NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100). The chitin column was washed 6 times volume with buffer A followed by a second wash with

6 times volume with buffer A with NaCl concentration adjusted at 1.5 M. A 2 times volume of cleavage buffer (20 mM HEPES (pH 8.0), 1.5 M NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 100 mM DTT) was then passed through the column to distribute DTT evenly throughout the resin and the flow was arrested. The column was incubated at 16° C for 48 h. Fractions (3 ml) containing the recombinant leptin were obtained by eluting the column 3 X bed volume of elution buffer (20 mM HEPES (pH 8.0), 2M NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100). All fractions were analyzed in a 12% SDS-PAGE and a protein with mobility of authentic leptin eluted in the first 10 fractions. Visualization of the proteins was performed by Coomassie blue staining. Protein concentrations were estimated using the Dc Protein Assay (Biorad, Mississauga, ON) and fractions containing leptin were pooled and glycerol was added to a final concentration of 20% (v/v). The purified recombinant protein was used to generate polyclonal antibodies in rabbits against the porcine leptin.

Progesterone Radioimmunoassay (RIA)

Medium collected at termination of cultures was assayed for progesterone according to procedures previously described [28] employing antibody provided by Dr. G.D. Niswender (Colorado State Univ.). The intra-assay coefficient of variation, calculated between duplicates, ranged from 3-9%. The interassay value, calculated from four samples present in all assays, ranged from 5-11 %.

Immunoblotting

Three wells per treatment were pooled to provide sufficient protein for detection by Western blot. Solubilized granulosa cells were homogenized on ice in TED buffer (50 mM Tris, pH 8.0; 10 mM EDTA and 1 mM DEDTC) containing 2 mM octyl glucoside (Sigma) and centrifuged at 30,000 x g for 1 h at 4 C. The crude pellets (membranes,

nuclei, and mitochondria) were sonicated (8 sec/cycle, three cycles) in TED sonication buffer (20 mM Tris, pH 8.0; 50 mM EDTA; and 0.1 mM DEDTC) containing 32 mM octyl glucoside. The sonicates were centrifuged at 16,000 x g for 15 min at 4°C. The supernatants (solubilized cell extract) were stored at -70°C until electrophoresis was performed. The protein concentration was determined by the Bradford (Bio-Rad) protein assay. Nuclear protein extracted from immortalized human ovarian granulosa cells (provided by Dr. N. Auersperg, Univ. of British Columbia) that had been transiently transfected with a plasmid constitutively expressing the transcriptionally active form of SREBP-1 [(pSVSPORT1-ADD1-403; provided by K. Schoonjens (Univ. Louis Pasteur))] was used as a positive control for SREBP-1. For STAT-3, the positive control was a nuclear extract from EGF-stimulated A431 human carcinoma cells (Upstate Biotechnology, Lake Placid NY). Proteins (50 µg) in cell extracts were resolved by one-dimensional 5% SDS-PAGE minigel for 45 min at 200 V, then electrophoretically transblotted to PVDF membranes (Amersham Pharmacia Biotech, Arlington, Heights, IL). The membranes were washed in 0.1% (v/v) Tween 20 in Tris buffered saline (TTBS: 100 mM Tris, 0.9% sodium chloride, pH 7.5) and incubated with primary antibodies raised in mouse against the phosphorylated tyrosine-704 of the 92 kDa STAT-3 protein (Upstate Biotechnology), SREBP1 rabbit polyclonal antibody raised against a recombinant protein corresponding to amino acids 41-200 mapping near the amino terminus (Santa Cruz Biotechnology, Inc. SantaCruz, CA) and porcine leptin polyclonal antibody, raised against the recombinant leptin protein purified as described previously. The second antibody, horseradish peroxidase anti-rabbit/mouse IgG, was added in the same buffer. The signal was detected by adding the peroxidase substrate (ECL⁺ Plus kit, Amersham Pharmacia Biotech.), which produces

luminescence at the site of second antibody binding. Blots were then exposed to Kodak photographic films. The optical density of protein bands was quantified by scanning with a densitometer (Storm, Amersham Biosciences, Piscataway NJ) and consequent data analyzed with the NIH imaging program.

Transient transfection assays

The porcine StAR promoter-luciferase construct (pStAR1423Luc; 1553bp), provided by Dr. H. Lavoie, (Univ. of South Carolina) and the plasmid expressing the active form of SREBP1 were employed in transfection experiments. Porcine granulosa cells (8×10^6 well) were plated as described above. After attachment, cells were rinsed once with MEM medium with fetal bovine serum and antibiotics (above) for 30 min. Transfection medium (710 μ l/well) was prepared in MEM with 400 ng of plasmid DNA and 4 μ l of Effectene (Qiagen, Inc. Mississauga, ON). Cells were incubated with transfection medium for 24 h, after which the medium was replaced with new MEM containing treatments or vehicle for 12-24 h. At the end of the treatment period, cells were rinsed once at room temperature with PBS, lysed in 200 μ l of 1 X passive lysis buffer (Luciferase Assay System, Promega), and stored at -70°C until assayed. Cotransfection of the plasmid containing the *Renilla* luciferase gene under control of the SV40 early enhancer/promoter region was used to correct for differences in transfection efficiency. Luciferase assays were performed using the Dual Luciferase Reporter Assay System according to the manufacturer's instructions (Promega). Briefly, 70 μ l luciferase substrate was added to 10 μ l lysate, and luciferase activity was measured using a 20/20 luminometer (Lumat, LB-9507, version 5.03, Berthold technologies, Bad Wildbad-Germany). Luciferase data were expressed as the mean \pm SEM. Each luciferase assay experiment was performed in duplicate

within an experiment and experiments were repeated in three cell cultures from slaughterhouse ovaries collected on different days.

Statistical analyses

Hormone assay, optical density and promoter activity data were subjected to Shapiro's test to determine normality of distribution and Bartlett's test for the homogeneity of variance. In the absence of homogenous variance, the analysis was performed on square root-transformed data. Each experiment was repeated three times. In cases where pooling of samples within an experiment was necessary to provide sufficient material for analysis, randomized complete block ANOVA was employed to determine the presence of effects of treatment and time. Transfection experiments were subjected to nested ANOVA. In the presence of a significant F value in ANOVA, individual means were compared by the Student-Newman-Keuls procedure. The level of probability selected to determine significance was $p < 0.05$.

RESULTS

Expression and purification of recombinant porcine leptin

Recombinant human leptin was shown to induce direct effects in porcine granulosa cells. To ensure that these were pertinent to the species under study, recombinant pig leptin was produced and purified (Fig. 1). The apparent molecular weight of 16 kDa of the eluted leptin was consistent with the predicted molecular weight of leptin (Fig. 1A) and Western analysis with anti-porcine leptin antibodies confirmed the authenticity of the recombinant porcine leptin (Fig. 1B). The porcine antibody also recognized recombinant human leptin, which migrated identically in Western analysis (data not shown). The biological activity of recombinant porcine leptin was confirmed by comparing it to the effects of

the human recombinant leptin on the granulosa cell steroidogenesis in vitro. As the levels of progesterone were similar after treatments with both human and porcine recombinant leptin, all further experiments were performed with recombinant porcine hormone.

Leptin effects on progesterone accumulation in porcine granulosa cells

Recombinant porcine leptin, at doses of 10, 100 and 1000 ng/ml, was added to porcine granulosa cells that were then cultured over 12, 24 and 48 h and the progesterone accumulation in the medium was measured by RIA. ANOVA revealed highly significant effects of treatment ($p < 0.002$) and time ($p < 0.001$), with no significant interaction. Individual comparisons demonstrated the presence of progressive increases of progesterone in untreated control cultures from 12 through 48 h (Fig. 2, $P < 0.01$). The 100 ng/ml dose of recombinant leptin produced neither stimulation nor inhibition compared to control cultures (data not shown), and the high and low doses were therefore selected for further study. There was a biphasic variation in progesterone accumulation in medium at 24 h and 48 h in cultures treated with 10 or 1000 ng/ml recombinant leptin. The 10 ng/ml dose consistently increased progesterone accumulation, while 1000 ng/ml was inhibitory at 24 h ($p < 0.03$) and tended to be inhibitory at 48 h ($p < 0.08$). ANOVA revealed a significant treatment effect ($p < 0.001$) in granulosa cells cultured with leptin, FSH, IGF-I or their combinations. Individual comparison of means (Fig. 3) demonstrated that leptin 10 ng/ml increased ($p < 0.05$) the accumulation of progesterone. IGF-I and FSH, alone or in combination, increased the progesterone concentrations in media relative to control ($p < 0.01$). Leptin at 10 ng/ml, in the presence of FSH resulted in an increase of the stimulation of that produced by either reagent alone, with a mean similar to the combination of FSH and IGF-I. Leptin at 10 ng/ml did not further stimulate progesterone in the presence of

FSH and IGF-1 relative to the combination of FSH+IGF-1 alone. The higher dose of leptin (1000 ng/ml), prevented the IGF-I-induced stimulation of progesterone accumulation, and interfered with FSH+IGF-I induced increases in progesterone concentration in cell media (Fig. 3, $p < 0.05$).

Leptin effects on granulosa cell cycle and total protein in porcine granulosa cells

It was judged important to determine whether the doses of leptin employed affected the numbers of granulosa cells in culture, either by induction of mitosis or by increasing the frequency of cell death by apoptosis. Fig. 4 is a representative flow cytometric evaluation of populations of granulosa cells treated with 10 and 1000 ng/ml of recombinant leptin over 48 h in culture. There was no significant variation in the pattern of distribution of the cell population across the cell cycle. In fact, the majority of granulosa cells was in G0-G1 phase in both control and treated cultures. The proportion of the cell populations that had reduced total DNA, indicative of apoptosis, did not differ among control and treatments. In addition, total protein analysis indicated that, after 12, 24 and 48 h in culture, granulosa cells had virtually identical levels of total protein, and there were no significant differences among control cultures and those treated with leptin at 10 or 1000 ng/ml (data not shown). Together these results demonstrate there was no effect of leptin on cell populations.

Leptin effects on STAT-3 phosphorylation in porcine granulosa cells

To examine the effect of recombinant porcine leptin on granulosa cell signaling pathways, we first evaluated the ability of leptin to induce STAT3 phosphorylation. In preliminary trials, leptin treatment elevated phosphorylation of STAT3, with maxima at 15 min and in a profile that

was dose dependent (Fig. 5). We then undertook short-term treatments (15 min) with the two doses of leptin in cells previously cultured for 12, 24 or 48 h. As above, analysis of variance revealed significant effects of treatment ($p < 0.03$) and time ($p < 0.008$) with a significant interaction ($p < 0.01$). Individual comparison of means (Fig. 6) indicate that both doses of leptin increased STAT-3 phosphorylation at all times tested, and that the abundance of phosphorylated STAT-3 over the 15 min window was greater at 24 and 48 h relative to 12 h ($p < 0.05$).

Sterol Regulatory element binding protein 1 (SREBP1) abundance after leptin treatment of porcine granulosa cells

To confirm the proteolytic activation of SREBP1 after leptin treatment, we measured the concentration of the 68 kDa, transcriptionally active form of SREBP in granulosa cells by immunoblot. ANOVA demonstrated significant effects of treatment ($p < 0.05$) but not time. Individual comparisons (Fig. 7) indicated that mature SREBP1 increased with time in control cultures such that the 48 h control value was greater than the corresponding 12 h control ($p < 0.05$). At all time points studied, there was an increase in 68 kDa SREBP in cultures treated with 10 ng/ml leptin ($p < 0.001$). In contrast, in cultures treated with 1000 ng/ml dose of leptin, the transcriptionally active form of SREBP1 did not differ from control, while they were consistently lower than in cultures treated with 10 ng/ml leptin ($p < 0.03$). The immunoblots were performed with the SREBP1 rabbit polyclonal antibody raised against amino acids 41-200, mapping near the amino terminus. This antibody also interacts the band corresponding to the precursor form of the SREBP1 which migrates at approximately 125 kDa. The pattern of expression of the precursor was directly proportional of the active form, i.e. the low dose of leptin increased the 125 kDa form, while the high dose reduced it (data not shown). This

suggests that the effect of leptin was on both *de novo* synthesis of SREBP1 and its cleavage to the mature form.

Leptin and SREBP1 regulate the StAR promoter

Given the effects of leptin on SREBP1 and steroidogenesis, we sought to determine target genes that might be involved, with the focus on StAR, the rate-limiting protein in steroid synthesis. As shown in Figure 8, transfection of the StAR promoter-reporter plasmid resulted in constitutive promoter activity in excess of that resulting from the empty plasmid control ($p < 0.05$). Leptin alone at 10 ng/ml increase StAR promoter luciferase activity by 1.5 to 2 fold over constitutive luciferase expression ($p < 0.05$), while the 1000 ng/ml dose had no effect. Cotransfection of the plasmid constitutively expressing the transcriptionally active form of SREBP1 elevated promoter activity 2-3 fold over basal levels ($p < 0.05$), and addition of leptin at 10 ng/ml significantly increased the signal. When higher doses of recombinant leptin (1000 ng/ml) were used, the luciferase signal was reduced to constitutive levels (Fig. 8, $p < 0.05$).

DISCUSSION

Herein we report the generation and purification of recombinant porcine leptin. Its authenticity has been confirmed by Western blot using antibodies that interact with human leptin. We have previously demonstrated the presence of the long form of the leptin receptor in the cell model that we have employed in this investigation, primary cultures of pig granulosa cells [7]. The current investigation provides new information to indicate that recombinant porcine leptin can stimulate the JAK-STAT pathway in this model, resulting in time-dependent phosphorylation of STAT-3. The importance of leptin to successful reproduction is evidenced by infertility in mice bearing mutations that prevent synthesis of

biologically active leptin [6] or the leptin receptor [29]. Further, fertility can be restored in female mice lacking in leptin by treatment with leptin [3], and exogenous leptin accelerates the onset of puberty in immature rats [30]. While the general view has been that the principal effects of leptin are on the neuroendocrine component of reproduction ([31] for review) evidence has emerged to indicate the presence of direct effects on the ovary. Indeed, functional leptin receptors are expressed in the ovary of numerous species, including the human [5], mouse [4], rat [6, 13], and pig [7]. Further, in the pig ovary, transcripts and protein consistent with the full length leptin receptor, increase with progesterone synthetic capacity, both in vitro and in vivo [7]. Leptin receptor abundance in the hypothalamus is believed to govern the biological actions of leptin [32]. Intuitively, it seems unlikely that leptin, a hormone that has positive effects on gonadotropin secretion and ovarian function in vivo, should have direct negative effects on the ovary. This notwithstanding, conflicting observations among species and among experimental paradigms have prevented the development of a consistent view of the effect of leptin on steroidogenesis. The occurrence of direct stimulatory effects on progesterone production, as we have demonstrated for the 10 ng/ml dose, are in contrast to many of the studies of granulosa cells in vitro. Equally rare is evidence for the direct inhibitory effects on progesterone synthesis that we have shown for the higher dose, as most studies show leptin inhibits of some combination of gonadotropin and growth factor stimulation of steroidogenesis, and, more specifically, estrogen synthesis [33]. Spicer and associates [8, 9] first demonstrated that leptin impaired insulin, or insulin and IGF-I in combination with FSH stimulation of progesterone and estradiol accumulation in cultures of bovine granulosa cells in serum-free medium. This finding was confirmed in rat [11, 13] and

in human granulosa cultures [14]. Nonetheless, another investigation demonstrated that leptin at 1 ng/ml increased P450aromatase expression and estradiol 17 β accumulation in luteinized human granulosa cells, with no effect on progesterone [15]. In that study, there was positive interaction between leptin, IGF-I and FSH in induction of P450aromatase expression. In light of the inconsistency among these investigations, we repeated this experimental paradigm using pig granulosa cells cultured with serum as a model. As previously shown [34], FSH and IGF-I increased progesterone accumulation, as did the low dose of leptin, consistent with the other experiments herein reported. Further, our higher dose, in the 10^{-7} M range, clearly inhibited progesterone accumulation stimulated by FSH, IGF-I or their combination. The latter results conform to the view that the inhibitory effects of leptin include interference with ligand-induced steroidogenesis. At the doses we employed (10^{-10} to 10^{-7} M), the effects of leptin were biphasic with respect to stimulation and inhibition of progesterone synthesis. Findings of stimulation by low doses (10^{-10} , 10^{-9} M) and inhibition by higher doses (10^{-8} , 10^{-7} M) of leptin in ovarian cells in vitro concur with observations of the effects of leptin on GnRH release from median eminence-arcuate nucleus explants in the rat [35]. Leptin has been shown to release LH and FSH from pituitary cultures in a pattern in which low doses are stimulatory and higher doses ineffective [35, 36], again consistent with the view that low doses of leptin have stimulatory effects. Granulosa cells in their luteinized state in vivo, i.e. in highly vascularized porcine corpus luteum [37], are subject to circulating leptin which ranges from 1.5-5 ng/ml in concentration [38 and H.L. Watt, B.R. Downey and B.D. Murphy, unpublished. The 10 ng/ml dose employed in vitro in the present study is in the same order of magnitude as found in circulation, suggesting that the results are of physiologic significance. In the process of

luteinization in the pig, there is a reduction in P450aromatase expression by the granulosa cells [34]. Given the other studies that have demonstrated that leptin inhibits P450aromatase expression and activity, and our observation that physiological doses of leptin increase progesterone synthesis, we postulate that leptin plays a role in the process of luteinization. This view is supported by observations that leptin receptor abundance in granulosa cells increases with luteinization in vitro and in vivo in the pig [7], and leptin binding increases with time in culture (and presumably luteinization) of bovine granulosa cells [9]. This hypothesis merits further investigation.

The present investigation provides new insight into the mechanism for the direct effects of leptin on the ovary through modulation of SREBP1 cleavage and consequent effects on the expression of StAR. Leptin directly affects the abundance of SREBP transcripts in adipose [22], hepatic and pancreatic tissues [39]. In these studies, administration of high levels of leptin in vivo [22] or over-expression of leptin in vitro [39], diminished SREBP1 mRNA. This is consistent with the current observation that the precursor (125 kDa) form of SREBP1 is in lower abundance in cells treated with 1000 ng/ml leptin. There is no precedent for either up-regulation of the transcriptionally active form of SREBP1 by the low doses of leptin, or its down-regulation by the high dose. It is well known that cleavage to the mature form is regulated by intracellular sterol concentrations [21, 40], thus the up- and down-modulation of the mature form of SREBP1 in the present study may be secondary to alteration of intracellular cholesterol concentrations, and may reflect the changes in steroid synthesis. In this study, we have shown that the low dose of leptin alone caused modest but statistically significant increase in porcine StAR promoter activity in a homologous cell system. Transfection of a plasmid

constitutively expressing SREBP1 increases porcine StAR gene promoter activity in primary cultures of porcine granulosa cells. The role of SREBP as a positive regulator of the StAR gene has previously been shown in other species [24, 41]. The current investigation is the first to demonstrate that leptin interacts with SREBP in StAR gene transcription. It is of interest that the pattern of activity recapitulates the effects of leptin, both in progesterone accumulation and in expression of the precursor and mature forms of SREBP1. The low dose of leptin is clearly stimulatory, while the high dose is inhibitory. The mechanism of these interactions is not currently known. Tena-Sempare et al. [42] recently demonstrated that high doses of leptin (10^{-8} and 10^{-7} M) reduced the expression of both steroidogenic factor 1 (SF-1) and StAR in response to gonadotropin treatment of rat Leydig cells. SF-1 is a transcription factor essential for StAR expression [43]. Thus, it is reasonable to postulate that the negative effects of the high dose of leptin in the present study result from down-regulation of SF-1. Whether the converse is true for low doses awaits further experimentation.

In summary, the experiments in this investigation demonstrate that two doses of porcine leptin, 10 ng/ml and 1000 ng/ml, stimulate phosphorylation of STAT3 in pig granulosa cells in vitro. The low dose of leptin increased progesterone accumulation by luteinized porcine granulosa cells in vitro, while the high dose was inhibitory. The low dose of porcine leptin increased both the precursor and mature forms of SREBP1 while high doses decreased both. Low doses of leptin interacted with SREBP1 to increase the transcription of a StAR promoter-luciferase construct. Again, the high dose had an inhibitory effect. The present study provides evidence that physiologic doses of leptin are stimulatory to steroidogenesis and may play a role in the process of luteinization.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Mira Dobias for her high quality technical work in aid of this investigation, Dr. H. Lavoie for generously sharing her protocols for transfection of primary porcine granulosa cells and Dr. Alan K. Goff for statistical advice.

REFERENCES

1. Caro JF, Sinha MK, Kolaczynski JW, Zhang PL, Considine RV. Leptin: the tale of an obesity gene. *Diabetes* 1996; 45: 1455-1462.
2. Barash IA, Cheung CC, Weigle DS, Ren H, Kabigting EB, Kuijper JL, Clifton DK, Steiner RA. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology* 1996; 137: 3144-3147.
3. Chehab FF, Lim ME, Lu R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet* 1996; 12: 318-320.
4. Kikuchi N, Andoh K, Abe Y, Yamada K, Mizunuma H, Ibuki Y. Inhibitory action of leptin on early follicular growth differs in immature and adult female mice. *Biol Reprod* 2001; 65: 66-71.
5. Karlsson C, Lindell K, Svensson E, Bergh C, Lind P, Billig H, Carlsson LM, Carlsson B. Expression of functional leptin receptors in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 4144-4148.
6. Duggal PS, Van Der Hoek KH, Milner CR, Ryan NK, Armstrong DT, Magoffin DA, Norman RJ. The in vivo and in vitro effects of exogenous leptin on ovulation in the rat. *Endocrinology* 2000; 141: 1971-1976.

7. Ruiz-Cortes ZT, Men T, Palin MF, Downey BR, Lacroix DA, Murphy BD. Porcine leptin receptor: molecular structure and expression in the ovary. *Mol Reprod Dev* 2000; 56: 465-474.
8. Spicer LJ, Chamberlain CS, Francisco CC. Ovarian action of leptin: effects on insulin-like growth factor-I- stimulated function of granulosa and thecal cells. *Endocrine* 2000; 12: 53-59.
9. Spicer LJ, Francisco CC. The adipose obese gene product, leptin: evidence of a direct inhibitory role in ovarian function. *Endocrinology* 1997; 138: 3374-3379.
10. Spicer LJ, Francisco CC. Adipose obese gene product, leptin, inhibits bovine ovarian thecal cell steroidogenesis. *Biol Reprod* 1998; 58: 207-212.
11. Zachow RJ, Weitsman SR, Magoffin DA. Leptin impairs the synergistic stimulation by transforming growth factor-beta of follicle-stimulating hormone-dependent aromatase activity and messenger ribonucleic acid expression in rat ovarian granulosa cells. *Biol Reprod* 1999; 61: 1104-1109.
12. Guo X, Chen S, Xing F. [Effects of leptin on estradiol and progesterone production by human luteinized granulosa cells in vitro]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2001; 36: 95-97.
13. Zachow RJ, Magoffin DA. Direct intraovarian effects of leptin: impairment of the synergistic action of insulin-like growth factor-I on follicle-stimulating hormone-dependent estradiol-17 beta production by rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 1997; 138: 847-850.
14. Ghizzoni L, Barreca A, Mastorakos G, Furlini M, Vottero A, Ferrari B, Chrousos GP, Bernasconi S. Leptin inhibits steroid biosynthesis

- by human granulosa-lutein cells. *Horm Metab Res* 2001; 33: 323-328.
15. Kitawaki J, Kusuki I, Koshihara H, Tsukamoto K, Honjo H. Leptin directly stimulates aromatase activity in human luteinized granulosa cells. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 708-713.
16. Fei H, Okano HJ, Li C, Lee GH, Zhao C, Darnell R, Friedman JM. Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 7001-7005.
17. Banks AS, Davis SM, Bates SH, Myers MGJ. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J Biol Chem* 2000; 275: 14563-14572.
18. Tartaglia LA. The leptin receptor. *J Biol Chem* 1997; 272: 6093-6096.
19. Baumann H, Morella KK, White DW, Dembski M, Bailon PS, Kim H, Lai CF, Tartaglia LA. The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 8374-8378.
20. Hua X, Yokoyama C, Wu J, Briggs MR, M.S. B, Golstein JL, Wan X. SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993; 90: 11603-11607.
21. Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 1997; 89: 331-340.
22. Soukas A, Cohen P, Socci ND, Friedman JM. Leptin-specific pattern of gene expression in white adipose tissue. *Gen. Dev.* 2000; 14: 963-980.

23. Barkan D, Jia H, Dantes A, Vardimon L, Amsterdam A, Rubinstein M. Leptin modulates the glucocorticoid-induced ovarian steroidogenesis. *Endocrinology* 1999; 140: 1731-1738.
24. Shea-Eaton WK, Trinidad MJ, Lopez D, Nackley A, McLean MP. Sterol regulatory element binding protein-1a regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene. *Endocrinology* 2001; 142: 1525-1533.
25. Li XM, Juorio AV, Murphy BD. Angiotensin II interferes with steroidogenesis in porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 1995; 53: 791-799.
26. Robert C, Palin M-F, Coulombe N, Roberge C, Silversides F, Benkel B, McKay R, Pelletier G. Backfat thickness in pigs is positively associated with leptin mRNA levels. *Can J Anim Sci* 1998; 78.
27. Agarwal SK, Vogel K, Weitsman SR, Magoffin DA. Leptin antagonizes the insulin-like growth factor-I augmentation of steroidogenesis in granulosa and theca cells of the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 1072-1076.
28. Pescador N, Houde A, Stocco DM, Murphy BD. Follicle-stimulating hormone and intracellular second messengers regulate steroidogenic acute regulatory protein messenger ribonucleic acid in luteinized porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 1997; 57: 660-668.
29. Clement K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, Gormelen M, Dina C, Chambaz J, Lacorte JM, Basdevant A, Bougneres P, Lebouc Y, Froguel P, Guy-Grand B. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 1998; 392: 398-401.
30. Almog B, Gold R, Tajima K, Dantes A, Salim K, Rubinstein M, Barkan D, Homburg R, Lessing JB, Nevo N, Gertler A, Amsterdam

- A. Leptin attenuates follicular apoptosis and accelerates the onset of puberty in immature rats. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 183: 179-191.
31. Brann DW, Wade MF, Dhandapani KM, Mahesh VB, Buchanan CD. Leptin and reproduction. *Steroids* 2002; 67: 95-104.
32. Bennett PA, Lindell K, Wilson C, Carlsson LM, Carlsson B, Robinson IC. Cyclical variations in the abundance of leptin receptors, but not in circulating leptin, correlate with NPY expression during the oestrous cycle. *Neuroendocrinology* 1999; 69: 417- 423.
33. Greisen S, Ledet T, Moller N, Jorgensen JO, Christiansen JS, Petersen K, Ovesen P. Effects of leptin on basal and FSH stimulated steroidogenesis in human granulosa luteal cells. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000; 79: 931-935.
34. Pescador N, Stocco DM, Murphy BD. Growth factor modulation of steroidogenic acute regulatory protein and luteinization in the pig ovary. *Biol Reprod* 1999; 60: 1453-1461.
35. Yu WH, Kimura M, Walczewska A, Karanth S, McCann SM. Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997; 94: 1023-1028.
36. Tezuka M, Irahara M, Ogura K, Kiyokawa M, Tamura T, Matsuzaki T, Yasui T, Aono T. Effects of leptin on gonadotropin secretion in juvenile female rat pituitary cells. *Eur J Endocrinol* 2002; 146: 261-266.
37. Murphy BD, Gevry N, Ruiz-Cortes T, Cote F, Downey BR, Sirois J. Formation and early development of the corpus luteum in pigs. *Reproduction Supplement* 2001; 58: 47-63.
38. Barb CR, Barrett JB, Kraeling RR, Rampacek GB. Serum leptin concentrations, luteinizing hormone and growth hormone secretion

- during feed and metabolic fuel restriction in the prepuberal gilt. *Domest Anim Endocrinol* 2001; 20: 47-63.
39. Kakuma T, Lee Y, Higa M, Wang Z, Pan W, Shimomura I, Unger RH. Leptin, troglitazone, and the expression of sterol regulatory element binding proteins in liver and pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 8536-8541.
 40. Goldstein JL, Rawson RB, Brown MS. Mutant mammalian cells as tools to delineate the sterol regulatory element-binding protein pathway for feedback regulation of lipid synthesis. *Arch Biochem Biophys* 2002; 397: 139-148.
 41. Christenson LK, Osborne TF, McAllister JM, Strauss JF, 3rd. Conditional response of the human steroidogenic acute regulatory protein gene promoter to sterol regulatory element binding protein-1a. *Endocrinology* 2001; 142: 28-36.
 42. Tena-Sempere M, Manna PR, Zhang FP, Pinilla L, Gonzalez LC, Dieguez C, Huhtaniemi I, Aguilar E. Molecular mechanisms of leptin action in adult rat testis: potential targets for leptin-induced inhibition of steroidogenesis and pattern of leptin receptor messenger ribonucleic acid expression. *J Endocrinol* 2001; 170: 413-423.
 43. Sugawara T, Holt JA, Kiriakidou M, Strauss JF, 3rd. Steroidogenic factor 1- dependent promoter activity of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene. *Biochemistry* 1996; 35: 9052-9059.

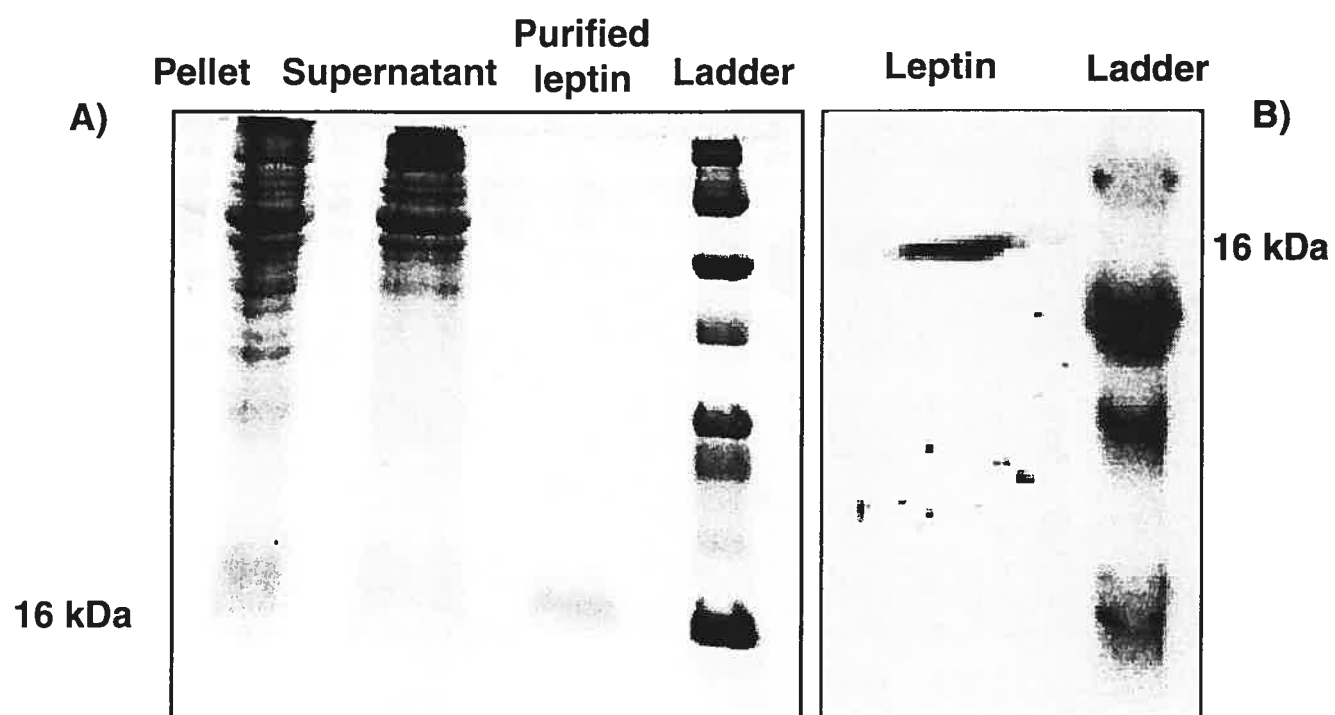


Figure 1. Analysis of the expression and purification of recombinant porcine leptin. **A)** SDS-PAGE pattern showing purified leptin protein. Lane 1: pellet fraction after sonication and centrifugation; lane 2: soluble fraction containing the leptin-intein fusion protein before passage through the chitin column; lane 3: purified recombinant leptin after DTT cleavage and elution from chitin column; lane 4: molecular mass markers; **B)** Western blot analysis of purified recombinant leptin. Lane 1: purified leptin; lane 2: molecular mass marker.

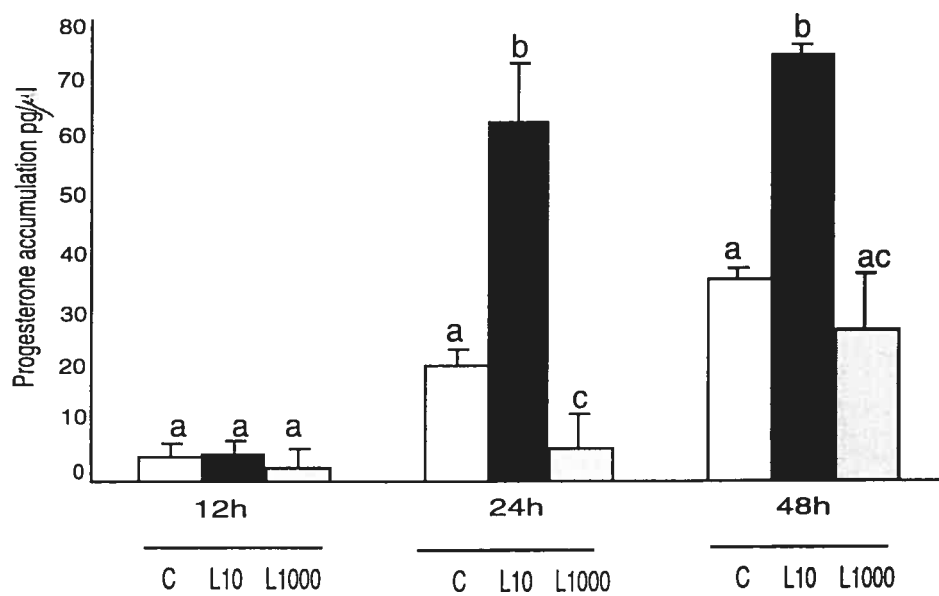


Figure 2. Progesterone accumulation in porcine granulosa cells in culture over 12, 24 and 48 h after incubation with medium alone. Treatments were control (open bars), 10 ng/ml (solid bars) or 1000 ng/ml (shaded bars) leptin. Means are derived from three independent experiments, and means with different letters differ significantly ($P < 0.05$).

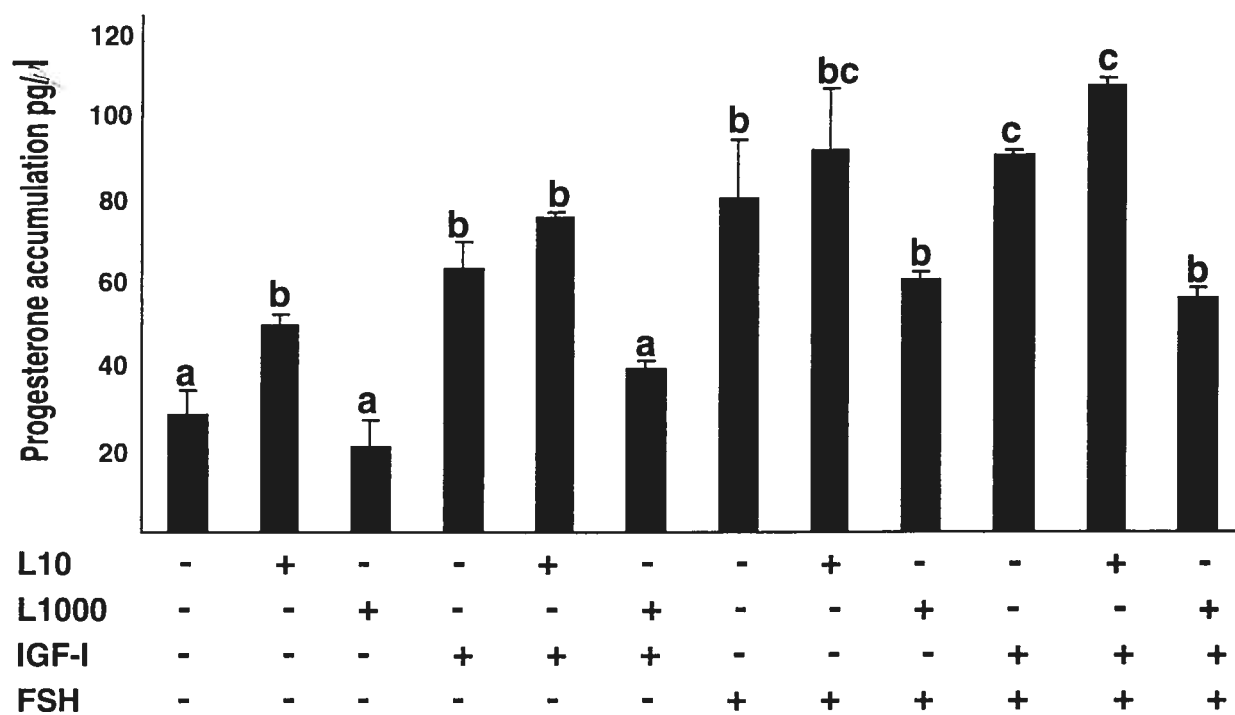
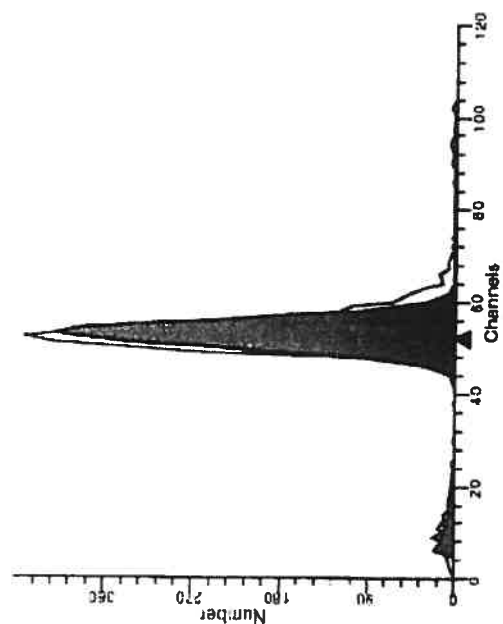
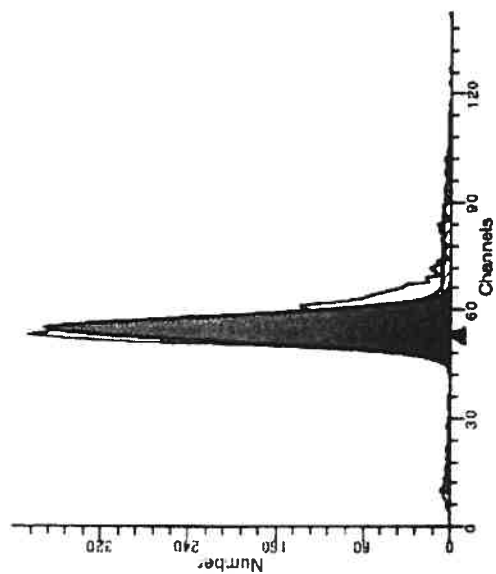


Figure 3. Progesterone accumulation in granulosa cell cultures terminated at 48 h after incubation with medium alone (control), leptin (10 and 1000 ng/ml), IGF-I (100 ng/ml) and FSH (100 ng/ml) or combinations of high and low leptin doses with FSH, IGF-I and FSH+IGF-I. Results are presented as mean \pm SEM resulting from three independent experiments. Means with different letters differ significantly ($P < 0.05$).

C) L1000ng/ml



B) L10ng/ml



A) Control

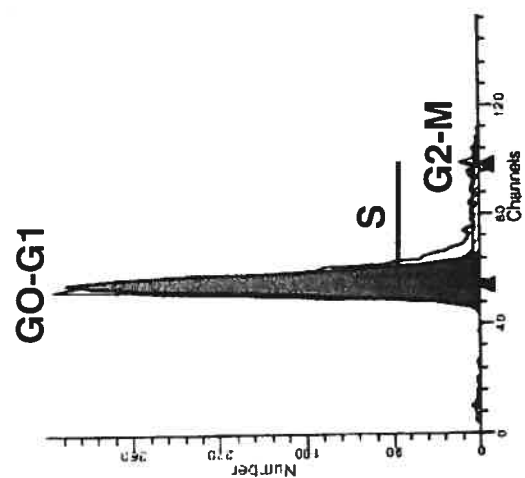


Figure 4. Analysis of the porcine granulosa cell cycle using flow cytometry. Granulosa cell cultures were terminated at 48 h after incubation with medium alone (control, **A**), medium + 10 ng/ml leptin (**B**), or medium + 1000 ng/ml leptin (**C**). The cell cycle phases (G0-G1, S and G2-M) are indicated in **A**. The G0-G1 phase is shaded and thus includes the majority of granulosa cells. The figure is representative of three independent experiments.

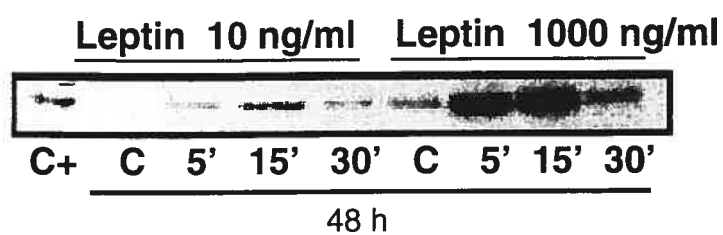


Figure 5. Immunoblot showing the time course of expression of phosphorylated STAT-3 protein in primary cultures of porcine granulosa cells treated with 10 or 1000 ng/ml recombinant porcine leptin for 5-30 min beginning at 48 h after initiation of culture. Antibodies raised in mice against the phosphorylated tyrosine-704 of the STAT-3 protein were employed, and bands migrating at approximately 92 kDa are shown. Untreated cells (C), are followed by cells derived from cultures terminated at 5, 15 and 30 min after treatment with leptin. The positive control (C+) represents phosphorylated STAT-3 from cell lysate of the epidermal growth factor-stimulated A432 human carcinoma cell line.

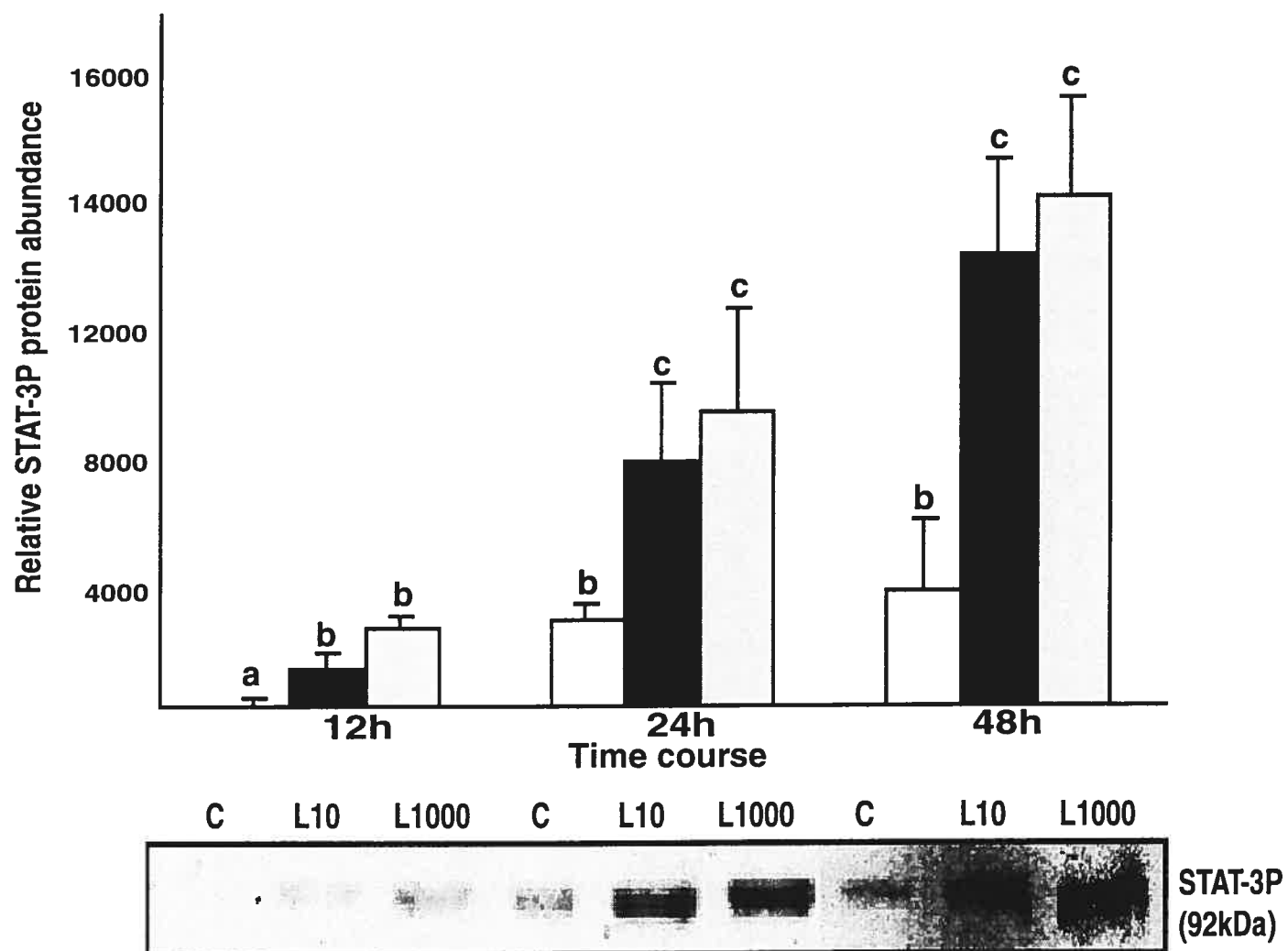


Figure 6. Western analysis demonstrating the relative protein abundance of phosphorylated STAT-3 in porcine granulosa cells cultured for 12, 24 or 48 h and then treated for 15 min with 0 (open bars) 10 (solid bars) or 1000 (shaded bars) ng/ml leptin. The upper panel depicts mean (\pm SEM) of densitometric scans of the band migrating at approximately 92 kDa from three independent granulosa cell cultures. Means with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

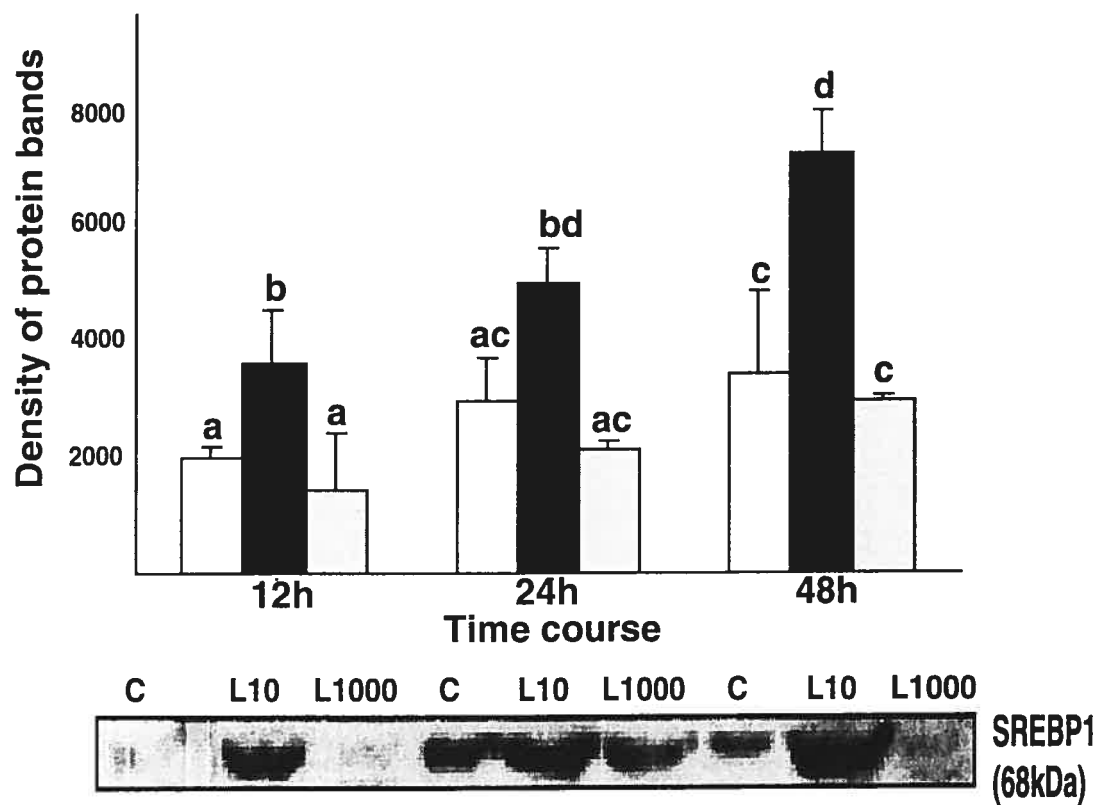


Figure 7. Immunoblot of proteins from porcine granulosa cells over 12, 24, and 48h in culture treated with 10 or 1000 ng/ml of porcine recombinant leptin. A rabbit polyclonal antibody raised against amino acids 41-200 mapping near the amino terminus of SREBP1 was used. The upper panel is the mean (\pm SEM) three replicate experiments and comprises the nondimensional densitometric scans of the band migrating at approximately 68 kDa (mature or transcriptionally active form of SREBP1). Controls are designated by open bars, 10 ng/ml leptin by solid bars and 1000 ng/ml leptin by shaded bars. Means with different letters are significantly different ($P < 0.05$). This figure is representative of three independent analyses.

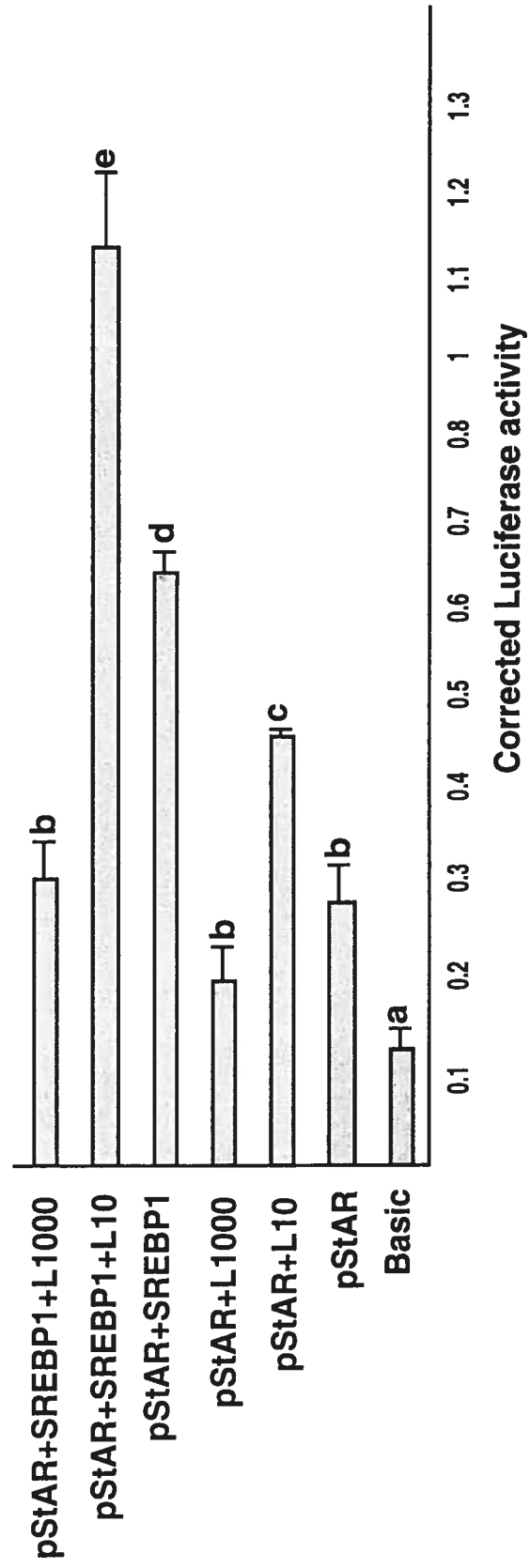


Figure 8. Mean (\pm SEM) corrected luciferase activity in primary porcine granulosa cells transiently transfected with 400 ng of the porcine StAR promoter-luciferase construct (pStAR1423Luc; 1553bp), the active form of SREBP-1 (pSVSPORT1-ADD1-403) or the promoterless luciferase plasmid, pGL3-basic. Cells were cotransfected with simian virus 40 *Renilla*-luciferase control vector to correct for transfection efficiency. Cells were treated for 24 h after transfection with 10 and 1000 ng/ml of porcine recombinant leptin. Means of three independent experiments are depicted, and those with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

DISCUSSION GÉNÉRALE

L'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de notre projet a permis d'approfondir nos connaissances sur l'interface nutrition-reproduction et ses éventuelles voies métaboliques.

LE PARADIGME PORCIN

Nous avons choisi le modèle porcin pour plusieurs raisons. La viande de porc représente une part importante des protéines animales utilisées dans l'alimentation mondiale, principalement dans l'alimentation humaine, soit $9,3 \cdot 10^6$ Mt en Amérique du Nord ($8,4 \cdot 10^6$ Mt É.U et Canada $9,1 \cdot 10^5$ Mt) et $2,8 \cdot 10^6$ Mt en Amérique du Sud, et a un impact certain sur l'économie des pays producteurs. En effet, selon l'Organisation des nations unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO; www.fao.org), la production de viande de suidé en Amérique a augmenté de manière considérable pendant les 40 dernières années. Entre 1961 et 2000, la production en Amérique du Nord et en Amérique du Sud est respectivement passée de 5,7 Mt (5,2 Mt aux États-Unis et $5,34 \cdot 10^5$ t au Canada) et $9,86 \cdot 10^5$ t à 10,2 Mt (8,6 Mt aux États-Unis et 1,6 Mt au Canada) et 3 Mt. Du côté des exportations, l'augmentation entre 1961 et 2000 est encore plus marquée : respectivement de 63.000 et 4.964 Mt à $1,25 \cdot 10^6$ ($5,91 \cdot 10^5$ Mt aux États-Unis et 661.500 Mt au Canada) et 205.137 Mt. On comprend pourquoi le porc est l'objet de nombreux projets de recherche dans le domaine des sciences biomédicales et vétérinaires. D'autre part, les consommateurs de plus en plus préoccupés par leur alimentation exigent une viande maigre. Or, le rendement reproducteur et de production des animaux sélectionnés pour ce caractère est affecté. En effet, des analyses historiques (1975-1990) ont révélé que les truies maigres

(moins de 14 mm de gras dorsal) produisaient moins de porcelets durant leur vie reproductive que les truies plus grasses (Gaughan *et al.*, 1995). Retour en chaleur tardif, portée de taille réduite (Young *et al.*, 1990), le rendement de reproduction à la deuxième gestation est souvent décevant chez ces truies. Pour illustrer ceci il faudrait mentionner la race de porc Chinoise Meishan laquelle avec un haut pourcentage de gras corporel présente une arrivée à la puberté plus rapide comparée aux races occidentales. Les truies Meishan sont aussi connues par leur nombre de porcelets plus élevé avec des taux de mortalité embryonnaire et fœtal réduits (Guay *et al.*, 2001).

Cependant, l'excès ou l'insuffisance de tissu adipeux provoque de l'infertilité. Le manque de tissu adipeux amène une réduction de la sécrétion de gonadotropines attribuée au manque de leptine (Caprio *et al.*, 2001), qui interfère avec la fonction ovarienne et retarde l'arrivée de la puberté. Les effets néfastes de la sous-alimentation et du manque de tissu adipeux sur les premiers stades de la gestation sont bien documentés chez le porc. Ils sont peut-être dus à des effets de blocage des activités de transport et de sécrétion de l'ovocyte, de la capacité de sécrétion de progestérone par l'ovaire (Foxcroft, 1997), de la survie embryonnaire, de la croissance du conceptus, de la formation placentaire, ou de la synthèse des hormones foetoplacentaires (Prunier and Quesnel, 2000).

Bref, la carence en gras nuit à la fertilité. Si l'influence néfaste du gras a été largement étudiée chez l'ensemble des mammifères, dont l'être humain, il ne faut pas oublier que le gras a aussi son utilité.

Le modèle des cultures de cellules de granulosa porcine utilisé dans les expériences *in vitro* a été bien caractérisé dans notre laboratoire. *In vitro*, la période s'étendant de la 12^e à la 96^e heure de culture correspond à la lutéinisation comme en témoigne la perte de l'expression de la P450

aromatase et l'acquisition de l'expression de la StAR et de la capacité de synthétiser de la progestérone. En outre, les cellules subissent aussi les changements morphologiques caractéristiques de la différenciation des cellules de granulosa en cellules lutéales, soit le passage de la forme ronde au phénotype de cellule épithéliale pavimenteuse (Murphy, 2000; Pescador *et al.*, 1999).

Le modèle du porc est donc très approprié pour les études *in vivo* et *in vitro* sur les interactions nutrition-reproduction comme la nôtre.

INTERFACE NUTRITION-REPRODUCTION

Comme nous l'avons mentionné, le tissu adipeux est maintenant considéré comme un organe endocrinien en raison des nombreux facteurs qu'il sécrète, facteurs qui prennent la circulation pour aller exercer leur action dans les autres tissus. La leptine, un des principaux produits du gras, a été choisi comme sujet de ce projet parce que ses effets centraux (hypothalamus, hypophyse) sont bien connus chez plusieurs espèces, mais ses effets locaux dans les gonades le sont beaucoup moins. La découverte de la leptine en 1994 (Zhang *et al.*, 1994), a généré une vague de leptomanie : en effet, de 1994 à 2000, près de 700 publications ont été consacrées à la leptine et à son éventuel rôle de médiateur métabolique de la fonction reproductrice (article de revue, Spicer, 2001). Les articles portaient plus précisément sur la détection de l'ARNm de la leptine dans différents tissus reproducteurs (ovaire, testicules, utérus, placenta, hypothalamus, hypophyse antérieure, tissu adipeux) chez différentes espèces (porc, vache, brebis, rat, souris, humain), et sur la localisation des récepteurs de la leptine et/ou de leur ARNm dans l'ovaire (cellules de granulosa, thèque et corps jaune), les testicules (spermatocytes, cellules de Leydig), l'hypophyse, l'hypothalamus, le placenta et l'utérus chez ces

mêmes espèces. Enfin, entre 1996 et 2000, huit articles ont été publiés sur la présence des récepteurs de la leptine dans l'ovaire (niveaux d'ARNm et de protéine et liaison du récepteur) chez l'humain, le rat, la vache, et le porc (Cioffi *et al.*, 1996; Cioffi *et al.*, 1997; Karlsson *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 2000; Ruiz-Cortés *et al.*, 2000; Spicer and Francisco, 1997;1998; Zamorano *et al.*, 1997). Des deux articles portant sur la leptine porcine, le nôtre était le premier à décrire la structure moléculaire et l'expression dans des cellules de granulosa et de la thèque (Ruiz-Cortés *et al.*, 2000).

RÉCEPTEURS ET ISOFORMES

L'étude de l'effet d'une hormone dans un tissu donné commence en toute logique par l'examen de l'expression de ses récepteurs et de ses capacités fonctionnelles. Le récepteur de la leptine porcine présente une élevée homologie entre l'homme, le rat et la souris ce qui indique une forte conservation de la protéine parmi ces espèces. En plus, des caractéristiques moléculaires de sa partie extracellulaire décrites dans l'article du chapitre II de cette thèse, le récepteur possède dans son domaine intracellulaire des régions boîte 1 et boîte 2 bien conservées par rapport aux autres récepteurs membres de la famille des cytokines 1 (Murakami *et al.*, 1991) et par rapport au récepteur de la leptine chez la souris (Ghilardi *et al.*, 1996). Ces régions représenteraient les sites de liaison des Janus kinases de la cascade intracellulaire (Ihle and Kerr, 1995) et seraient donc très importantes. De même, le motif YXXQ (consensus pour la liaison des STAT-3) se retrouve dans le domaine cytoplasmique du récepteur de porc (Ruiz-Cortés *et al.*, 2000; Tartaglia *et al.*, 1995). Ceci nous a encouragé à poursuivre nos recherches sur les mécanismes intracellulaires en cause.

Les séquences obtenues ont permis la mise au point d'une sonde d'ADN utilisée pour des réactions de type Northern. Il a ensuite été possible de décrire le patron d'expression des transcrits du récepteur dans plusieurs tissus porcins (reins, foie, rate, poumons, cerveau, testicules, utérus, ovaires, corps jaune, thèque, granulosa). Mentionnons ici qu'en raison de la quasi ubiquité de l'expression des ARNm du récepteur, il s'est avéré difficile de trouver un témoin négatif des analyses de type Western lors de l'étude de l'expression de la protéine et c'est pourquoi on ne retrouve aucune donnée à ce sujet dans cette étude. En effet, la sonde homologue au domaine extracellulaire commun aux diverses isoformes s'est hybridée avec les différents ARNm des isoformes du récepteur de la leptine présentes dans les tissus étudiés (1.3, 1.5, 4, et 4.4 kb). Six isoformes du récepteur de la leptine ont été décrites, dont une soluble (voir l'introduction). Chez d'autres espèces, les isoformes sont le résultat d'épissages alternatifs et leur présence se traduit par l'expression de récepteurs avec des domaines intracellulaires longs ou courts (Tartaglia *et al.*, 1995; Tartaglia, 1997). Les formes courtes pourraient interagir avec les formes longues et même assurer la régulation de leur activité (Banks *et al.*, 1996). Chez l'humain (Karlsson *et al.*, 1997) et chez la souris (Lee *et al.*, 1996), les isoformes longues et courtes sont présentes dans l'ovaire. Nous avons donc voulu savoir si ces isoformes étaient présentes dans l'ovaire de porc. D'après les références bibliographiques consultées, le poids moléculaire de la forme longue du récepteur varierait entre 130 et 200 kDa, variation qui peut s'expliquer par des modifications post-traductionnelles de la protéine comme la glycosylation et les ponts disulfures (Bjorbaek *et al.*, 1997; Ghilardi and Skoda, 1997; Haniu *et al.*, 1998). Grâce à la généreuse collaboration du docteur Ghilardi, nous avons pu utiliser le même anticorps anti-OB-R de souris que ces auteurs et avons

détecté au moins quatre isoformes à 175, 130, 100 et 80 kDa. La bande qui migre à 175 kDa correspondrait, dans l'ovaire porcin, à l'isoforme longue du récepteur. La protéine de 175 kDa est présente en quantité maximale au milieu de phase lutéale du cycle oestral du porc et augmente dans les cellules de granulosa pendant qu'elles se lutéinisent *in vitro*. Dans les modèles *in vivo* et *in vitro*, il y a correspondance avec la bande d'ARN de 4,4 kb obtenue par les analyses de type Northern.

En ce qui concerne les bandes qui migrent plus vite, nous ne savons pas vraiment à quoi elles correspondent. Il pourrait s'agir d'isoformes courtes ou de récepteurs partiellement dégradés (Ghilardi and Skoda, 1997).

RÉCEPTEURS ET FONCTION LUTÉALE

Nous avons démontré que lors de la lutéinisation *in vivo* des corps jaunes de porc, les niveaux de l'ARNm et des protéines de l'OB-R atteignent un pic puis diminuent parallèlement à la régression lutéale. De manière similaire, les cellules de granulosa, qui lutéinisent *in vitro* et qui présentent une accumulation logarithmique de P4, connaissent une augmentation progressive des transcrits et de la protéine OB-R. On observe donc une corrélation entre l'expression des récepteurs de la leptine et les niveaux maximums de P4 dans les deux modèles : la leptine aurait donc un effet positif sur la fonction lutéale.

Le corps jaune, un des tissus les plus angiogénique connu à ce jour, est capable de stimuler l'angiogenèse dans une grande variété de systèmes *in vivo* et *in vitro* (Redmer and Reynolds, 1996). Plusieurs facteurs de croissance potentiellement angiogènes (angiopoïétines, facteur de croissance épidermique, facteur de croissance fibroblastique, facteur de croissance de type insulinique, facteur de croissance transformant et facteur

de croissance endothélial et vasculaire (VEGF) et leurs récepteurs sont présents dans le corps jaune (Reynolds *et al.*, 2000). Chez le porc, le corps jaune est formé de cellules de thèque, de cellules de granulosa, de cellules vasculaires et de cellules réticulo-endothéliales (Murphy *et al.*, 2001). Les techniques d'extraction utilisées pour la détection des récepteurs de la leptine n'ont pas permis la séparation des différents types de cellules ni la localisation exacte de ces récepteurs dans un compartiment cellulaire spécifique. Malgré ceci, c'est bien connu que la leptine induit l'angiogenèse (Bouloumie *et al.*, 1998) et que des récepteurs OB-Rb (isoforme longue) s'expriment dans la vascularisation humaine et dans les cultures cellulaires primaires d'endothélium humain. *In vivo*, la leptine induit la néovascularisation dans la cornée chez le rat normal, mais pas chez le rat *fa/fa*, qui ne possède pas de récepteurs de la leptine (Bouloumie *et al.*, 1998).

Nous spéculons alors que la grande capacité angiogène du corps jaune, décrite dans la littérature serait en partie imputable à la leptine, qui génèrerait, par l'entremise de l'activation de l'OB-R, des facteurs de croissance qui stimulent le processus angiogène (formation de nouveaux vaisseaux sanguins). Peu après l'ovulation, les éléments vasculaires envahissent le compartiment folliculaire de manière centripète à partir de la thèque puis latéralement entre les veines et artères centrales. Ces vaisseaux sont le véhicule de dispersion des cellules thécales stéroïdogènes à travers le corps jaune (Murphy *et al.*, 2001). Ils assurent aussi le passage dans la circulation générale des grandes quantités de progestérone produites au milieu de la phase lutéale.

LA LEPTINE ET LA COMMANDE MÉTABOLIQUE DE LA REPRODUCTION

Il est désormais prouvé de manière irréfutable que la leptine sert d'intermédiaire moléculaire entre le tissu adipeux et la reproduction. Les deux hypothèses sur les mécanismes par lesquels la leptine assurerait le pont entre les deux systèmes sont des plus intéressantes.

Selon l'hypothèse lipostatique, il existerait un contrôleur de la quantité de tissu adipeux qui inhiberait la reproduction et augmenterait la prise alimentaire quand la quantité de gras descend sous un certain seuil (Kennedy, 1953). Selon la version moderne de cette hypothèse, le niveau de leptine serait indicatif de la quantité de gras dans l'organisme (Campfield *et al.*, 1996; Chehab *et al.*, 1997; Friedman and Halaas, 1998; Stephens and Caro, 1998).

Cependant, les niveaux de leptine reflètent souvent davantage les variations à court terme de la disponibilité de ce que nous appellerons les carburants oxydables (glucose, triglycérides, acides gras libres...) que la quantité de gras. Des processus physiologiques comme la reproduction, la croissance et la longévité très énergivores et non essentiels à la survie immédiate passent en dernier lors de l'attribution des ressources énergétiques : si d'autres défis énergétiques se présentent, la reproduction sera inhibée à coup sûr. Le comportement reproductif est donc influencé par la prise alimentaire, l'exercice, le gras corporel, la température ambiante, tous des facteurs qui influencent la disponibilité des carburants métaboliques destinés à l'oxydation cellulaire. La sécrétion de leptine est davantage influencée par la disponibilité de ces substances que par celle du gras : on devrait donc parler d'un signal métabolique. Cette idée est d'ailleurs à la base de la deuxième hypothèse dite métabolique.

Chez plusieurs espèces, le traitement à la leptine annule les effets du jeûne sur les processus reproducteurs, un phénomène sans doute lié aux mécanismes de maintien de l'homéostasie des carburants. La reproduction, la prise alimentaire et le partage énergétique pourraient être considérés comme des réponses homéostatiques sous la commande d'un système sensoriel qui effectue une veille des signaux métaboliques. On a suggéré que ces signaux sont produits à la suite de la variation de disponibilité et d'oxydation des carburants métaboliques intracellulaires et non du gras ou d'autres éléments de la composition corporelle. Dans ce cas, la leptine serait médiatrice ou modulatrice de ces signaux intracellulaires (Schneider *et al.*, 2000).

La leptine serait donc un « adipostat », mais la régulation du système reproducteur passerait non seulement par la l'adiposité et les niveaux de leptine, mais aussi par des variations plus subtiles de la disponibilité des carburants et donc de l'énergie. L'ensemble de ces caractéristiques contribue à expliquer les effets biphasiques sur la production de P4 observés et décrits au chapitre III : les effets éventuels des différentes doses de leptine utilisées lors des expériences *in vitro* serait le reflet de ce qui se passe *in vivo*. Les différentes doses de leptine, une fois celles-ci mises en relation avec l'adiposité de l'animal, simuleraient en quelque sorte une certaine disponibilité des substrats oxydables chez l'animal *in vivo*, ce qui expliquerait les deux modes de réponse intracellulaire (stimulation et/ou inhibition).

Les effets de la leptine associés à l'augmentation de l'oxydation et à la diminution de l'apport calorique limitent beaucoup l'utilité de cette molécule pour le traitement à long terme de l'infertilité.

EFFETS INHIBITEURS DE LA LEPTINE SUR LA STÉROÏDOGENÈSE

Difficile de concilier la corrélation positive entre la présence des récepteurs de la leptine et la fonction lutéale *in vivo* et *in vitro* mentionnée auparavant (chapitre II) avec la prépondérance des indications d'un effet inhibiteur de la leptine sur les cellules stéroïdogènes. Le traitement *in vitro* de 10 ng/ml utilisé dans cette expérience correspond en gros aux concentrations sanguines (1.5-5ng/ml) retrouvées chez le porc (Barb *et al.*, 2001b) : les effets positifs de la leptine sur le processus de lutéinisation correspondraient donc à une réalité physiologique comme semble l'indiquer l'augmentation des récepteurs de la leptine pendant la lutéinisation des cellules *in vitro* (Chapitre II).

Nos études avec le modèle des cellules de granulosa de porc (Chapitre III) nous amènent à conclure que l'effet inhibiteur de la leptine apparaît à la suite de l'administration d'une dose pharmacologique (1000 ng/ml), soit la quantité retrouvée chez un individu soumis à des défis énergétique extrêmes et dont l'organisme répond par un blocage de la stéroïdogénèse, un processus très énergivore à l'instar de la reproduction comme on l'a déjà mentionné. Cette inhibition par la leptine est confirmée par l'abolition des effets stimulants bien connus de la FSH seule, de l'IGF-1 seul ou des deux ensemble sur l'accumulation de P4 (Ruiz-Cortés *et al.*, 2003) et par la diminution de l'expression du SF1, de la StAR et du P450scc induite par l'hCG dans les testicules de rat (Tena-Sempere *et al.*, 2001). La leptine inhiberait donc la stéroïdogénèse induite par d'autres ligands.

Les doses utilisées par ces derniers auteurs sont de 10^{-7} , 10^{-8} et 10^{-9} M de leptine recombinante humaine ce qui correspond approximativement à des doses de 16, 160 et 1600 ng/ml d'hormone. L'effet inhibiteur mentionné est

dose-dépendente incluant la dose de 160 ng/ml. Également, des études *in vitro* chez les rats montrent les effets négatifs de la leptine à des doses élevées de 10^{-7} et de 10^{-8} M sur la libération de GnRH par des neurones du noyau arqué mises en culture (Yu *et al.*, 1997). Ces résultats sont différents de ceux mentionnés au chapitre III, dont la dose de 100 ng/ml n'a pas montré des effets. Nous n'avons pas d'explication exacte pour ce phénomène. Il pourrait s'agir du manque d'interaction entre les différentes sortes de cellules présentes dans l'ovaire et qui ne se présente pas dans le modèle *in vitro* utilisé.

Nous spéculons aussi que dans le modèle *in vitro* utilisé dans cette étude, les cellules de granulosa porcine en culture ne sont sensibles à l'effet inhibiteur de la leptine recombinante porcine qu'à des doses très élevées (pharmacologiques) de 1000 ng/ml. La voie déclenchée par la leptine à cette dose, semble alors ne pas s'activer qu'en cas de surexposition à l'hormone. Comme présenté au chapitre II, après avoir trouvé que la dose de 100 ng/ml n'avait pas d'effets sur les concentrations de P4 accumulées dans le milieu de culture comparé aux contrôles, il s'est avéré logique de ne plus utiliser cette dose pour la suite de l'étude. Cependant, il reste à poursuivre des études pour essayer de trouver les possibles causes de cette insensibilité ainsi les effets de variations moins drastiques de traitements entre 10 et 100 ng/ et entre 100 et 1000 ng/ml, et étudier le potentiel seuil d'activité de la leptine sur ce type de cellules.

D'autre part, l'aspect moléculaire de l'inhibition cellulaire *in vitro* pourrait s'expliquer par un rétrocontrôle négatif de la leptine par ses propres récepteurs. L'excès de ligand peut faire en sorte que l'internalisation et la dégradation des récepteurs s'accroît pour aboutir au blocage de la voie intracellulaire puis de la stéroïdogénèse. Une autre possibilité demeure : la leptine inhiberait l'expression de la P450 aromatasase

et la synthèse d'oestradiol, dont on sait qu'elle survient pendant la lutéinisation *in vitro* (Pescador *et al.*, 1999). Il faudra pousser plus loin les études pour caractériser ces effets *in vivo*.

STIMULATION DE LA STÉROÏDOGENÈSE PAR LA LEPTINE

Les effets positifs de la leptine comprennent l'accumulation de P4 pendant la lutéinisation des cellules de granulosa porcines *in vitro* en parallèle avec l'augmentation des transcrits et de la protéine des récepteurs de la leptine (Ruiz-Cortés *et al.*, 2000). Il se produit une stimulation de l'activité P450 aromatasase et par conséquent une augmentation de la synthèse des oestrogènes dans les follicules ovariens. Nous avons lancé l'hypothèse que la leptine jouerait un rôle crucial dans le processus de lutéinisation, mais ceci devra être étudié plus à fond. L'administration pulsatile de leptine par perfusion à des neurones a eu des effets positifs (Woller *et al.*, 2001), mais à long terme, on observe une inhibition : la durée du traitement serait donc une variable dont il faudrait tenir compte lors de l'évaluation des effets des doses de leptine. De manière générale, nous avons constaté que l'exposition à de faibles doses pendant des périodes de 12 à 96 h, ce qui correspondrait à des concentrations physiologiques, se traduit par une stimulation.

LEPTINE COMME FACTEUR DE CROISSANCE OU SIGNAL DE PROLIFÉRATION

Les effets de la leptine sur la prolifération de plusieurs types de cellules chez différentes espèces ont été amplement étudiés depuis la découverte de l'hormone. La liste ne cesse de s'accroître et parmi les cellules cibles de la leptine, et dont la prolifération est stimulée, on pourrait citer : les cellules rénales (Wolf *et al.*, 1999), hématopoïétiques et

endothéliales (Park *et al.*, 2001), hépatiques (Leclercq *et al.*, 2003) les ostéoblastes et chondrocytes (Maor *et al.*, 2002), les cellules de la glande mammaire (Hu *et al.*, 2002), les cellules pancréatiques (Tanabe *et al.*, 1997), adrénales (Glasow *et al.*, 1999), hypophysaires (Jin *et al.*, 1999), les pulmonaires (Tsuchiya *et al.*, 1999), gastriques et épithéliales du colon (Hardwick *et al.*, 2001) et les lymphocytes, monocytes-macrophages (Lord *et al.*, 2002). Les principales voies qui seraient activées selon les auteurs sont celles de MAPK, la stimulation de cytokines (TNF- α , IL-6, TGF- β), de cyclines (D1), le synergisme avec IGF-I et ses récepteurs, entre autres. En ce qui concerne les tissus reproducteurs, Spicer et col. (1997) ont démontré que les cellules de theca bovine étaient stimulées dans leur prolifération par des doses de leptine de 30 et 300 ng/ml. Également, dans des follicules de rats, des niveaux de leptine faible ou une diminution de la prise alimentaire (qui se traduit également par une diminution des concentrations de leptine circulante), ont donné comme résultat une inhibition de la prolifération des neutrophiles et des monocytes-macrophages présents dans la thèque interne des follicules (Duggal *et al.*, 2002).

D'autres part, comme présenté au chapitre III de cette étude, dans des cellules de granulosa porcine la leptine des doses de 10, 100 et 1000 ng/ml n'ont pas d'effet sur la viabilité, ni sur la prolifération des cellules en culture. Des résultats similaires ont été publiés par Spicer et col. (1998) dans des cellules de granulosa bovine où la leptine bovine à 30 et 300 ng/ml n'a pas stimulé la prolifération de ces types de cellules.

L'explication de ces résultats n'est pas claire. Dans notre modèle un aspect à tenir compte c'est que les cellules de granulosa sont en voie de lutéinisation. Ceci est en quelque sorte initié par l'addition de sérum fœtal bovin dans le milieu au début de la culture. Les facteurs de croissance

présents dans ce sérum stimulent le début de la différenciation terminale des cellules vers des cellules lutéinisées et caractérisées par une activité proliférative très réduite. Dans ces conditions, le traitement à la leptine semble incapable d'imposer son effet prolifératif comme c'est le cas dans la panoplie de cellules décrites auparavant. L'existence de cellules qui ne prolifèrent pas *in vivo*, comme les neurones, mais qui expriment des récepteurs à la leptine, est un autre exemple de la modalité de régulation non-proliférative de la leptine.

Bref, la leptine peut bien être considérée comme un facteur de croissance étant donné ses effets sur la prolifération de plusieurs types de cellules qui prolifèrent facilement *in vitro*. Cependant, il ne faut pas oublier le complexe système d'interaction avec d'autres facteurs pour réguler également la différenciation et le fonctionnement de diverses cellules.

VOIE INTRACELLULAIRE

Les premiers facteurs de transcription activés par la leptine sont les STAT-3. De manière très intéressante, l'effet biphasique décrit pour les autres facteurs qui sont en aval ne s'est pas présenté. En effet, nous avons démontré que l'expression de ces protéines STAT est stimulée par des doses faibles comme par des doses élevées ce qui indique une régulation par la leptine distalement aux STAT-3. En fait, comme mentionné dans les directions futures, ceci est un des aspects qui nécessite plus de recherches.

Nos recherches décrites au chapitre III ont permis également d'arriver à une conclusion au sujet des mécanismes par lesquels la leptine agit directement sur l'ovaire à travers la modulation du clivage des SREBP-1, qui se répercute ensuite sur l'expression de la StAR. La leptine affecte directement l'abondance des transcrits de SREBP-1 dans le tissu adipeux

(Soukas *et al.*, 2000), le foie et le pancréas (Kakuma *et al.*, 2000). Dans ces études, l'administration de doses élevées de leptine *in vivo* (Soukas *et al.*, 2000) ou la surexpression de leptine *in vitro* (Kakuma *et al.*, 2000) provoquent une diminution de l'ARNm de SREBP-1. Ceci concorde avec une autre de nos observations : la forme précurseuse de la SREBP-1 (125kDa) est moins abondante dans les cellules traitées avec 1000 ng/ml de leptine recombinante porcine. La littérature scientifique ne fait pas mention de la régulation positive de la forme transcriptionnellement active de la SREBP-1 par de faibles doses de leptine ou de sa régulation négative par des doses élevées. Il est bien connu que la régulation du clivage de la forme mûre de SREBP-1 dépend des concentrations intracellulaires de cholestérol (Brown and Goldstein, 1997; Goldstein *et al.*, 2002). Dans notre étude, la modulation négative et positive de cette forme mûre pourrait donc être secondaire aux variations intracellulaires des concentrations de cholestérol et constituer un reflet des changements dans la synthèse des stéroïdes.

Nos travaux ont permis de démontrer que de faibles doses de leptine recombinante sont suffisantes pour produire une augmentation modeste, mais statistiquement significative, de l'activité du promoteur de la StAR porcine dans un système cellulaire homologue (cellules primaires de granulosa porcine). En outre, dans le même système, la transfection d'un plasmide qui exprime constitutivement la SREBP-1 a entraîné l'augmentation de l'activité du promoteur de la StAR. L'effet de régulation positive du gène de la StAR par les SREBP a été démontré chez d'autres espèces (Christenson *et al.*, 2001; Shea-Eaton *et al.*, 2001), mais nos travaux sont les premiers à avoir démontré que la leptine agit conjointement avec la SREBP dans la transcription du gène de la StAR. La découverte d'un patron biphasique d'activation qui explique les effets de la

leptine sur l'accumulation de P4 et sur l'expression des formes mûres et précurseurs de la SREBP1 a évidemment constitué un temps fort de notre recherche. À faible dose, la leptine est clairement stimulante alors qu'elle est inhibitrice à dose élevée. Les mécanismes de ces différentes interactions ne sont pas encore bien connus. Tena-Sempere et ses collaborateurs (Tena-Sempere *et al.*, 2001) ont récemment démontré que des doses élevées de leptine (10^{-8} et 10^{-7} , soit 160 et 1600 ng/ml) réduisaient l'expression du facteur stéroïdogène 1 (SF-1) et de la StAR obtenue à la suite d'un traitement aux gonadotropines dans des cellules de Leydig. SF-1 étant un facteur de transcription essentiel pour l'expression de la StAR, il est raisonnable de postuler que les effets négatifs des doses élevées de leptine dans nos études pourraient résulter d'une régulation négative du SF-1. Il resterait à prouver qu'il se produit l'inverse avec un traitement à faible dose de leptine.

DIRECTIONS FUTURES

Le focus de cette thèse fut une des isoformes de récepteur de leptine dans l'ovaire. Comme futures études nous proposons d'étudier l'expression des isoformes courtes, les voies intracellulaires déclenchées, comparer avec les patrons déjà démontrés ici et les interactions dans les cellules ovariennes chez le porc.

Il serait intéressant de trouver s'il existe une régulation entre les isoformes du récepteur de leptine dans ce modèle comme ce qui a été décrit chez d'autres espèces. Par exemple, une possible régulation de la leptine circulante par le récepteur de leptine soluble (OB-Re), ce qui pourrait être étudié par des traitements *in vivo* (modèle murin ou porcin) avec la protéine du récepteur soluble recombinante. Également, il faudrait analyser la régulation négative de l'expression du récepteur de leptine par la leptine elle-même (à des doses élevées) comme possible explication des

effets biphasiques trouvés dans cette étude. La construction de chimères avec les fragments cytoplasmiques des isoformes du récepteur de leptine et le fragment extracellulaire des récepteur plus connus comme celui de la prolactine serait un modèle d'étude *in vitro*.

Les voies intracellulaires et les gènes sous la régulation de la leptine dans les tissus reproducteurs et neuroendocriniens sont mal connus à ce jour. Des études comme la nôtre contribuent à y voir un peu plus clair. Cependant, ils restent beaucoup de vides à remplir qui se constituent en potentiels projets pour continuer cette étude.

Il faudrait commencer des recherches à propos des facteurs qui sont régulés distalement aux STAT-3 et qui vont finalement aller agir sur les SREBP-1. C'est le « chaînon perdu » de cette thèse. En fait, nous considérons que c'est un point clé pour comprendre les effets biphasiques et les différents effets de doses élevées (insensibilité avec 100 ng/ml) démontrés dans cette étude.

Le blocage de l'expression des STAT-3 par des techniques de mutagenèse dirigée ou par des ARN antisens ou avec des ARN d'interférence (ARNi) dans notre modèle *in vitro* pourraient être utiles pour étudier les voies alternes déclenchées par la leptine et les isoformes de son récepteur.

En ce qui concerne la régulation de l'expression des protéines SREBP-1, nous proposons aussi des expériences *in vitro* avec des conditions de déplétion et/ou surexposition au cholestérol pour étudier les effets de la leptine et comment sa caractéristique biphasique se comporte.

D'autre part, la panoplie de publications indique que la leptine n'est qu'un facteur permmissible dans tout le système orchestré de l'homéostasie de l'ovaire porcin. En effet, les autres facteurs sécrétés par le tissu adipeux décrit au chapitre I et leur rôle dans l'ovaire, doivent être étudiés. Nous proposons spécifiquement l'étude de l'adiponectine comme hormone qui semble interagir et réguler les effets de la leptine, et de plus, étudier les interactions des niveaux d'insuline in vivo et in vitro de ces hormones pour mieux comprendre les interactions et le système de régulation locale dans l'ovaire chez le porc.

L'effet particulier biphasique trouvé dans cette étude, et avec le modèle in vitro chez le porc, devrait être étudié chez d'autres types de tissus de d'autres espèces. Aussi, l'extrapolation vers un modèle in vivo, comme chez les rongeurs, serait utile pour vérifier si les traitements à différentes doses de leptine se traduisent par des expressions variées des ADN et des protéines de gènes comme STAT-JAK, c-fos, c-jun, MAPK, SREBP, P450_{scc}, P450 aromatasase et plusieurs autres possiblement impliqués dans les voies de signalisation de la leptine et dans la stéroïdogénèse au niveau des gonades et ceci par des techniques d'hybridation in situ et d'immunofluorescence parmi tant d'autres.

Nous prévoyons que la technologie des micro-étalages (*microarrays*) d'oligonucléotides devrait aussi nous permettre de faire d'importants progrès dans ces domaines. Certes, avec cette technique on pourrait étudier l'expression différentielle des gènes comme réponse à des traitements à différentes doses de leptine porcine dans des tissus reproducteurs de porc in vivo et in vitro.

Par ailleurs, les effets épigénétiques de la leptine dans l'ovaire doivent être considérés dans les études à venir. Certes, la régulation locale est déjà démontrée mais les effets en amont du contrôle génique auraient

aussi un rôle dans le complexe mécanisme. Des résultats préliminaires dans notre laboratoire ont montré des effets de la leptine dans la modification de la chromatine des cellules ovariennes de rats en ce qui concerne la phosphorylation de la serine 10 de l'histone H3. Il reste à vérifier ces résultats chez le porc et à trouver, par des techniques de précipitation de chromatine par exemple, les promoteurs des gènes cibles spécifiques qui seraient impliqués.

Un aspect qui présente beaucoup d'intérêt dans l'étude de la leptine est bien sûr la possibilité de l'utiliser comme traitement contre l'obésité chez les humains. La découverte et la caractérisation rapide de la voie de signalisation de la protéine OB ont été importantes à plusieurs égards. Ainsi, nous disposons maintenant d'une théorie biologique et moléculaire pour expliquer la maladie de l'obésité. Elles ont également mené à des travaux sur la neurobiologie de l'ingestion et de l'équilibre énergétique. Ces recherches novatrices et fructueuses à ce jour devraient redonner espoir aux obèses qui se battent quotidiennement pour ne pas regagner le poids qu'ils ont si difficilement perdu.

La leptine exerce des effets sur une ribambelle de systèmes et de processus physiologiques. La plupart de ces effets semblent affecter directement ou indirectement le métabolisme énergétique. Le système de signalisation de la leptine a peut-être évolué pour devenir un moyen de fournir ou de réserver l'énergie et d'empêcher les dépenses énergétiques non essentielles, par exemple la reproduction, lorsque la survie est compromise. Comme le tissu adipeux constitue la plus grande réserve énergétique chez les espèces supérieures il n'est pas surprenant qu'il soit aussi le principal producteur de leptine après le placenta et l'estomac. On comprend aussi pourquoi les récepteurs de la leptine sont si largement distribués dans les tissus, qui deviennent alors capables de répondre à la

leptine. Ce caractère pléiotropique de la leptine démontre son importance comme régulateur, mais il rend aussi compliqué son utilisation thérapeutique. L'élucidation des mécanismes, entre autres les neuronaux, par lesquels la leptine exerce ses effets va se traduire par la mise au point de nouvelles approches thérapeutiques.

Il est logique de penser que, dans un avenir rapproché, la leptine, cette médiatrice de la fertilité, sera administrée à des animaux domestiques prépubères afin d'en accélérer la maturation sexuelle. En outre, l'administration de leptine exogène pourrait éventuellement permettre de raccourcir la période d'anoestrus post-partum chez les bovins, par exemple. Une analyse préalable complète de l'état de chair et du statut métabolique de l'animal s'imposerait alors. On sait qu'une augmentation postovulatoire des concentrations de leptine est associée au potentiel d'implantation chez les femmes traitées pour infertilité (Cioffi *et al.*, 1997). La leptine étant un important régulateur du développement de l'embryon préimplanté (Smith *et al.*, 2002), cela soulève la possibilité qu'une injection de leptine après des traitements de fécondation *in vitro* (IVF) puisse améliorer les taux d'implantation. Les chances de succès de cette thérapie à la leptine et son utilité devront faire l'objet de plusieurs études.

Par ailleurs l'utilisation de la leptine et de ses récepteurs comme marqueurs génétiques pour la sélection d'animaux plus efficaces du point de vue de la reproduction et du rendement de production présente un grand intérêt. Elle permettrait de répondre à la demande sans cesse croissante des consommateurs pour des protéines animales de qualité, on parle ici de viande maigre (voir chapitre I), dans les pays développés ou en voie de développement. La leptine et ses récepteurs sont des candidats potentiels comme loci de caractères quantitatifs (QTL) lors de la sélection assistée par marqueurs. Chez les animaux domestiques, l'utilisation thérapeutique de la

leptine est un outil intéressant lors de la manipulation des paramètres productifs et reproductifs. Il existe depuis peu des méthodes pour modifier les concentrations ou l'activité de la leptine circulante. En effet, les vecteurs constitués d'adénovirus recombinants se sont avérés un puissant système de transfert génique dans le cadre de la thérapie génique. Des études antérieures ont démontré que l'hyperleptinémie induite par adénovirus permettait d'obtenir une réduction rapide du gras corporel et de renverser la différenciation des adipocytes chez les rats (Zhou *et al.*, 1999). Lee et ses collaborateurs ont démontré qu'il était possible avec l'adénovirus de réaliser des transfections et d'obtenir l'expression génique pour ensuite manipuler les concentrations de leptine (Lee *et al.*, 1999). Il reste donc à essayer d'extrapoler ces résultats chez les grandes espèces.

CONCLUSIONS

Nous avons proposé un modèle pour la régulation, dans un contexte de privation alimentaire d'une durée plus ou moins longue, de la reproduction par des facteurs dérivés du tissu adipeux, soit une baisse de l'insuline menant à une diminution ou une élimination de l'adipogenèse. Les facteurs dérivés du tissu adipeux, en particulier la leptine, subissent une diminution simultanée. Cependant l'adiponectine, elle, est élevée, ce qui permettrait d'accroître la sensibilité périphérique aux concentrations réduites d'insuline. L'absence de facteurs stimulants dérivés du gras se traduit par une diminution de la fréquence des pulsations de gonadotropines stimulées par la GnRH et une inhibition de l'activité ovarienne. La réalimentation cause une augmentation rapide de la sécrétion d'insuline, laquelle pourrait agir dans les cellules ovariennes et neuronales rendues hypersensibles à l'insuline par l'adiponectine. En outre, les niveaux de leptine augmentent provoquant une augmentation de la sécrétion des gonadotropines puis l'induction du développement folliculaire et, ultimement, l'ovulation d'un plus grand nombre d'oocytes chez les espèces multipares.

Nos études ont permis de démontrer que la séquence des différents domaines du récepteur de la leptine porcine est conservée chez l'humain, le rat et la souris. Les ARNm du récepteur sont largement répartis dans plusieurs tissus différents chez le porc, mais leur expression est particulièrement marquée dans les organes reproducteurs comme l'utérus, l'ovaire, les cellules de la granulosa et le corps jaune. Dans les cellules de la granulosa et le corps jaune, il existe une corrélation entre, d'une part, les niveaux des transcrits et de la protéine du récepteur de la leptine et, d'autre part, la différenciation fonctionnelle et la lutéinisation. Étant donné les

indications sérieuses de l'existence d'effets de la leptine sur les cellules de la granulosa et de la thèque chez d'autres espèces, nos résultats suggèrent que la leptine exerce des effets locaux au niveau de l'ovaire porcin.

Les résultats des recherches présentées ici ont par la suite permis de démontrer que deux doses de leptine porcine recombinante, 10 ng/ml et 1000 ng/ml, stimulent la phosphorylation des STAT-3 dans les cellules de granulosa porcine *in vitro*. Une faible dose amène une augmentation de l'accumulation de progestérone par les cellules de granulosa lutéinisées *in vitro* et une forte dose, une diminution. Une faible dose de leptine porcine stimule l'expression du précurseur et de la forme mûre de la SREBP-1. Par contre, une dose de 1000 ng/ml inhibe les deux formes de la protéine. La faible dose de 10 ng/ml interagit avec la SREBP-1 pour stimuler la transcription du promoteur de la StAR. À nouveau, la dose élevée a des effets inhibiteurs. L'ensemble de ces données suggère que les doses physiologiques de leptine stimulent la stéroïdogénèse et pourraient jouer un rôle dans le processus de lutéinisation.

En résumé, les récepteurs de la leptine sont présents dans l'ovaire porcin et leur patron d'expression *in vivo* et *in vitro* est particulier dans les cellules ovariennes porcines en lutéinisation. La capacité de signalisation de ces récepteurs a été démontrée par des traitements avec différentes doses de leptine porcine recombinante. En effet, à la suite de l'exposition à des doses physiologiques de ligand, les récepteurs ont déclenché la phosphorylation des facteurs de transcription STAT-3, l'augmentation de l'expression des formes précurseuses et mûres des SREBP-1, l'augmentation de la transcription du promoteur du gène de la StAR et, ultimement, l'augmentation des concentrations de progestérone en raison de la stimulation par la leptine.

Finalement, le rôle du gène de l'obésité et de son récepteur dans le fonctionnement des cellules ovariennes chez le porc a été clairement démontré.

Le principal objectif de ce projet de recherche était de fournir de l'information de base qui permettrait de résoudre des problèmes concrets. Certes, les connaissances fondamentales obtenues grâce à ces travaux nous ont vraiment permis de mieux comprendre la fonction ovarienne de la leptine et les mécanismes physiologiques associés à l'interaction nutrition-reproduction, mais elles ont également ouvert plusieurs nouvelles avenues de recherche dans ce domaine de recherche jeune et déjà en explosion !

BIBLIOGRAPHIE

Ahima RS and Flier JS (2000) Leptin *Annu Rev Physiol* **62** 413-37

Auwerx J and Staels B (1998) Leptin *Lancet* **351** 737-42

Banks WA, Kastin AJ, Huang W, Jaspan JB and Maness LM (1996)

Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin
Peptides **17** 305-11

Banks AS, Davis SM, Bates SH and Myers MGJ (2000) Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor *J Biol Chem* **12** 14563-72

Barash IA, Cheung CC, Weigle DS, Ren H, Kabigting EB, Kuijper JL, Clifton DK and Steiner RA (1996) Leptin is a metabolic signal to the reproductive system *Endocrinology* **137** 3144-7

Barb CR, Kraeling RR, Rampacek GB and Dove CR (1997) Metabolic changes during the transition from the fed to the acute feed-deprived state in prepubertal and matures gilts *J Anim Sci* **75** 781-9

Barb CR, Hausman GJ and Houseknecht KL (2001a) Biology of leptin in the pig *Domest Anim Endocrinol* **21** 297-317

Barb CR, Barrett JB, Kraeling RR and Rampacek GB (2001b) Serum leptin concentrations, luteinizing hormone and growth hormone secretion during feed and metabolic fuel restriction in the prepuberal gilt *Domest Anim Endocrinol* **20** 47-63

Barkan D, Jia H, Dantes A, Vardimon L, Amsterdam A and Rubinstein M (1999) Leptin modulates the glucocorticoid-induced ovarian steroidogenesis *Endocrinology* **140** 1731-8

Baumann H, Morella KK, White DW, Dembski M, Bailon PS, Kim H, Lai CF and Tartaglia LA (1996) The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors *Proc Natl Acad Sci U S A* **93** 8374-8

- Bjorbaek C, Uotani S, da Silva B and Flier JS (1997)** Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor *J Biol Chem* **272** 32686-95
- Bjorbaek C, El-Haschimi K, Frantz JD and Flier JS (1999)** The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance *J Biol Chem* **274** 30059-65.
- Bjorbaek C, H.J. L, Bates SH, Olson RK, Davis SM, Flier JS and Myers MG (2000)** SOCS-3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr985 *J Biol Chem* **275** 40649-57
- Bjorbaek C, Buchholz RM, Davis SM, Bates SH, Pierroz DD, Gu H, Neel BG, Myers MGJ and Flier JS (2001)** Divergent roles of SHP-2 in ERK activation by leptin receptors *J Biol Chem* **276** 4747-55
- Bouloumie A, Drexler HC, Lafontan M and Busse R (1998)** Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis *Circ Res* **83** 1059-66
- Brann DW, Wade MF, Dhandapani KM, Mahesh VB and Buchanan CD (2002)** Leptin and reproduction *Steroids* **67** 95-104.
- Briggs MR, Yokoyama C, Wang X, Brown MS and Goldstein JL (1993)** Nuclear protein that binds sterol regulatory element of LDL receptor promoter. I. Identification of the protein and delineation of its target nucleotide sequence *J Biol Chem* **268** 14490-96
- Brown MS and Goldstein JL (1997)** The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor *Cell* **89** 331-40
- Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R and Burn P (1995)** Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks *Science* **269** 546-9

- Campfield LA, Smith FJ and Burn P** (1996) The OB protein (leptin) pathway--a link between adipose tissue mass and central neural networks *Horm Metab Res* **28** 619-32
- Campfield LA, Smith FJ, Penicaud L and Burn P** (1997) OB protein and its receptor: signal transduction between adipose tissue and central nervous system *Journ Annu Diabetol Hotel Dieu* 131-48
- Caprio M, Fabrini E, Isidori AM, Aversa A and Fabbri A** (2001) Leptin in reproduction *Trends Endocr Metab* **12** 65-72
- Carpenter LR, Farrugella TJ, Symes A, Karow ML, Yancopoulos GD and Stahl N** (1998) Enhancing leptin response by preventing SH2-containing phosphatase 2 interaction with OB receptor *Proc Natl Acad Sci USA* **95** 6061-6
- Chehab FF, Lim ME and Lu R** (1996) Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin *Nat Genet* **12** 318-20
- Chehab FF, Mounzih K, Lu R and Lim ME** (1997) Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin *Science* **275** 88-90
- Christenson LK, McAllister JM, Martin KO, Javitt NB, Osborne TF and Strauss JF III** (1998) Oxysterol regulation of steroidogenic acute regulatory protein gene expression. Structural specificity and transcriptional and posttranscriptional actions *J Biol Chem* **273** 30729-35
- Christenson LK, Osborne TF, McAllister JM and Strauss JF III** (2001) Conditional response of the human steroidogenic acute regulatory protein gene promoter to sterol regulatory element binding protein-1a *Endocrinology* **142** 28-36

- Chua SC, Jr., Chung WK, Wu-Peng XS, Zhang Y, Liu SM, Tartaglia L and Leibel RL** (1996) Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor *Science* **271** 994-6
- Cioffi JA, Shafer AW, Zupancic TJ, Smith-Gbur J, Mikhail A, Platika D and Snodgrass HR** (1996) Novel B219/OB receptor isoforms: possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction *Nat Med* **2** 585-9
- Cioffi JA, Van Blerkom J, Antczak M, Shafer A, Wittmer S and Snodgrass HR** (1997) The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles *Mol Hum Reprod* **3** 467-72
- Clark BJ, Wells J, King SR and Stocco DM** (1994) The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells *J Biol Chem* **269** 28314-22
- Clark BJ, Soo S-C, Caron KM, Ikeda Y and Parker KL** (1995) Hormonal and developmental regulation of the steroidogenic acute regulatory protein *Mol Endocrinol* **9** 1346-55
- Coleman DL** (1978) Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice *Diabetologia* **14** 141-48
- Considine RV and Caro JF** (1997) Leptin and the regulation of body weight *Int J Biochem Cell Biol* **29** 1255-72
- Conway GS and Jacobs HS** (1997) Leptin: a hormone of reproduction *Hum Reprod* **12** 633-5
- Cusin I, Sainsbury A, Doyle P, Rohner-Jeanrenaud F and Jeanrenaud B** (1995) The ob gene and insulin. A relationship leading to clues to the understanding of obesity *Diabetes* **44** 1467-70
- Duggal PS, Van Der Hoek KH, Milner CR, Ryan NK, Armstrong DT, Magoffin DA and Norman RJ** (2000) The in vivo and in vitro

effects of exogenous leptin on ovulation in the rat *Endocrinology* **141** 1971-6

Duggal PS, Ryan NK, Van der Hoek KH, Ritter LJ, Armstrong DT, Magoffin DA, Norman RJ (2002) Effects of leptin administration and feed restriction on thecal leucocytes in the preovulatory rat ovary and the effects of leptin on meiotic maturation, granulosa cell proliferation, steroid hormone and PGE2 release in cultured rat ovarian follicles *Reproduction* **23** 91-8

Dunn TG and Kaltenbach CC (1980) Nutrition and the postpartum interval of the ewe, sow, and cow *J Anim Sci* **2** 29-39

Dyer CJ, Simmons JM, Matteri RL and Keisler DH (1997) Effects of an intravenous injection of NPY on leptin and NPY-Y1 receptor mRNA expression in ovine adipose tissue *Domest Anim Endocrinol* **14** 325-33

Dyer CJ, Simmons JM, Matteri RL and Keisler DH (1997) Leptin receptor mRNA is expressed in ewe anterior pituitary and adipose tissues and is differentially expressed in hypothalamic regions of well-fed and feed-restricted ewes *Domest Anim Endocrinol* **14** 119-28

Estienne MJ, Schillo KK, Hileman SM, Green MA, Hayes SH and Boling JA (1990) Effects of free fatty acids on luteinizing hormone and growth hormone secretion in ovariectomized lambs *Endocrinology* **126** 1934-40

Fantuzzi G and Faggioni R (2000) Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis *J Leukoc Biol* **68** 437-46

Fei H, Okano HJ, Li C, Lee GH, Zhao C, Darnell R and Friedman JM (1997) Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors

(Ob-R) in mouse brain and other tissues *Proc Natl Acad Sci U S A* **94** 7001-5

Foxcroft GR (1997) Mechanisms mediating effects on embryonic survival in pigs *J Reprod Fert Suppl* **52** 47-61

Friedman JM and Halaas JL (1998) Leptin and the regulation of body weight in mammals *Nature* **395** 763-70

Fruhbeck G, Jebb SA and Prentice AM (1998) Leptin: physiology and pathophysiology *Clin Physiol* **18** 399-419

Gainsford T and Alexander WS (1999) A role for leptin in hemopoieses? *Mol Biotechnol* **11** 149-58

Gaughan JB, Cameron DA, Dryden GM and Josey MJ (1995) Effect of selection for leanness on overall reproductive performance *Animal Science* **61** 561-64

Gavrilova O, Barr V, Marcus-Samuels B and Reitman M (1997) Hyperleptinemia of pregnancy associated with the appearance of a circulating form of the leptin receptor *J Biol Chem* **272** 30546-51

Ghilardi N, Ziegler S, Wiestner A, Stoffel R, Heim MH and Skoda RC (1996) Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice *Proc Natl Acad Sci U S A* **93** 6231-5

Ghilardi N and Skoda RC (1997) The leptin receptor activates janus kinase 2 and signals for proliferation in a factor-dependent cell line *Mol Endocrinol* **11** 393-9

Ghizzoni L, Barreca A, Mastorakos G, Furlini M, Vottero A, Ferrari B, Chrousos GP and Bernasconi S (2001) Leptin inhibits steroid biosynthesis by human granulosa-lutein cells *Horm Metab Res* **33** 323-8

Glasow A, Bornstein SR, Chrousos GP, Brown JW, Scherbaum WA (1999) Detection of Ob-receptor in human adrenal neoplasms and effect of leptin on adrenal cell proliferation *Horm Metab Res* **31** 247-51

Golden PL, Maccagnan TJ and Pardrige WM (1997) Human blood-brain barrier leptin receptor: Binding and endocytosis in isolated human brain microvessels *J Clin Invest* **99** 14-8

Goldstein JL, Rawson RB and Brown MS (2002) Mutant mammalian cells as tools to delineate the sterol regulatory element-binding protein pathway for feedback regulation of lipid synthesis *Arch Biochem Biophys* **397** 139-48

Guay F, Palin M-F, Matte JJ and Laforest J-P (2001) Effects of breed, parity, and folic acid supplement on the expression of leptin and its receptors' genes in embryonic and endometrial tissues from pigs at day 25 of gestation *Biol Reprod* **65** 921-927

Guo X, Chen S and Xing F (2001) Effects of leptin on estradiol and progesterone production by human luteinized granulosa cells in vitro *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* **36** 95-7 (Chinese)

Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK and Friedman JM (1995) Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene *Science* **269** 543-6

Haniu M, Arakawa T, Bures EJ, Young Y, Hui JO, Rohde MF, Welcher AA and Horan T (1998) Human leptin receptor. Determination of disulfide structure and N- glycosylation sites of the extracellular domain *J Biol Chem* **273** 28691-9

- Hardwick JC, Van Den Brink GR, Offerhaus GJ, Van Deventer SJ, Peppelenbosch MP** (2001) Leptin is a growth factor for colonic epithelial cells *Gastroenterology* **121** 79-90
- Hartung S, Rust W, Balvers M and Ivell R** (1995) Molecular cloning and in vivo expression of the bovine steroidogenic acute regulatory protein *Biochem Biophys Res Comm* **215** 646-53
- Heldin CH** (1995) Dimerization of cell surface receptors in signal transduction *Cell* **80** 213-23
- Houseknecht KL, Boggs DL, Campion DR, Sartin JL, Kiser TE, Rampacek GB and Amos HE** (1988) Effect of dietary energy source and level on serum growth hormone, insuline-like growth factor-I, growth and body composition in beef heifers *J Anim Sci* **66** 2916-23
- Houseknecht KL, Baile CA, Matteri RL and Spurlock ME** (1998) The biology of leptin: a review *J Anim Sci* **76** 1405-20
- Hu X, Juneja SC, Maihle NJ, Cleary MP** (2002) Leptin: a growth factor in normal and malignant breast cells and for normal mammary gland development *J Natl Cancer Inst* **94** 1704-11
- Hua X, Yokoyama C, Wu J, Briggs MR, M.S. B, Golstein JL and Wan X** (1993) SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90** 11603-07
- Ihle J, Witthuhn BA, Quelle FW, Yamamoto K and Silvennoinen O** (1995) Signaling through the hematopoietic cytokine receptors *Annu Rev Immunol* **13** 369-98
- Ihle JN and Kerr IM** (1995) JAKs and STATs in signaling by the cytokine receptor superfamily *Trends Genet* **11** 69-74

- Jin L, Burguera BG, Couce ME, Scheithauer BW, Lamsan J, Eberhardt NL, Kulig E, Lloyd RV** (1999) Leptin and leptin receptor expression in normal and neoplastic human pituitary: evidence of a regulatory role for leptin on pituitary cell proliferation *J Clin Endocrinol Metab* **84** 2903-11
- Joneja B and Wojchowski DM** (1997) Mitogenic signaling and inhibition of apoptosis via the erythropoietin receptor Box-1 domain *J Biol Chem* **272** 11176-84
- Kakuma T, Lee Y, Higa M, Wang Z, Pan W, Shimomura I and Unger RH** (2000) Leptin, troglitazone, and the expression of sterol regulatory element binding proteins in liver and pancreatic islets *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** 8536-41
- Karlsson C, Lindell K, Svensson E, Bergh C, Lind P, Billig H, Carlsson LM and Carlsson B** (1997) Expression of functional leptin receptors in the human ovary *J Clin Endocrinol Metab* **82** 4144-8
- Kennedy C** (1953) The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat *Proc. Royal Soc. London* **140 B** 579-592
- Kennes YM, Murphy BD, Pothier F and Palin MF** (2001) Characterization of swine leptin (LEP) polymorphisms and their association with production traits *Anim Genet* **32** 215-8
- Kikuchi N, Andoh K, Abe Y, Yamada K, Mizunuma H and Ibuki Y** (2001) Inhibitory action of leptin on early follicular growth differs in immature and adult female mice *Biol Reprod* **65** 66-71.
- Kim JB, Spotts GD, Halvorsen YD, Shih H-M, Ellenberger T, Towle HC and Spiegelman BM** (1995) Dual DNA binding specificity of ADD-1/SREBP1 controlled by a single amino acid in the basic helix-loop-helix domain *Mol Cell Biol* **15** 2582-88

- Kitawaki J, Kusuki I, Koshiba H, Tsukamoto K and Honjo H (1999)**
Leptin directly stimulates aromatase activity in human luteinized granulosa cells *Mol Hum Reprod* **5** 708-713
- Kolaczynski JW, Considine RV, Ohannesian J, Marco C, Opentanova I, Nyce MR, Myint M and Caro JF (1996)** Responses to leptin in short-term fasting and refeeding in humans: a link with ketogenesis but not ketones themselves *Diabetes* **45** 1511-5
- Lacroix DA, Rohrer GA, Cue RI, Palin M-F and Murphy BD (2002)**
Polymorphic microsatellite in the porcine leptin receptor gene shows association with growth rate and fat accumulation *Anim Genet* submitted
- Leclercq IA, Field J, Farrell GC (2003)** Leptin-specific mechanisms for impaired liver regeneration in ob/ob mice after toxic injury *Gastroenterology* **124** 1451-64
- Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI and Friedman JM (1996)** Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice *Nature* **379** 632-5
- Lee K, Barb CR, Kraeling RR, Riley RT, Hartzell DL, McGraw RA, Azain MJ, Dean RG and Baile CA (1999)** Expression of beta-galactosidase and pig leptin gene in vitro by recombinant adenovirus *Ann Biotechnol* **10** 37-48
- Leininger MT, Portocarrero CP, Schinckel AP, Spurlock ME, Bidwell CA, Nielsen JN and Houseknecht KL (2000)** Physiological response to acute endotoxemia in swine: effect of genotype on energy metabolites and leptin *Domest Anim Endocrinol* **18** 71-82
- Li C and Friedman JM (1999)** Leptin receptor activation of SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase 2 modulates Ob receptor signal transduction *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** 9677-82.

- Lin J, Barb CR, Matteri RL, Kraeling RR, Chen X, Meinersmann RJ and Rampacek GB** (2000) Long form leptin receptor mRNA expression in the brain, pituitary, and other tissues in the pig *Dom Anim Endocrinol* **19** 53-61
- Lopez L and McLean MP** (1999) Sterol regulatory element-binding protein 1a binds to cis elements in the promoter of the rat high density lipoprotein receptor SR-B1 gene *Endocrinology* **140** 5669-81
- Lord GM, Matarese G, Howard JK, Bloom SR, Lechler RI** (2002) Leptin inhibits the anti-CD3-driven proliferation of peripheral blood T cells but enhances the production of proinflammatory cytokines *J Leukoc Biol* **72** 330-8
- Maffei M, Halaas J and Ravussin E** (1995) Leptin levels in human and rodent: measurements of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects *Nat Med* **1** 1155-61
- Maor G, Rochwerger M, Segev Y, Phillip M** (2002) Leptin acts as a growth factor on the chondrocytes of skeletal growth centers *J Bone Miner Res* **17** 1034-43
- Marti A, Berraondo B and Martinez JA** (1999) Leptin: Physiological actions *J Physiol Biochem* **55** 43-50
- Mejia- Guadarrama CA** (1999) Effets physiologiques de la leptine ENSA de Rennes *Mémoires /DEA-production animale* Université de Rennes 1, Station de recherche porcine-INRA-SAINT-GILLES .
- Montague CT, Farooqi IS and Whitehead JP** (1997) Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans *Nature* **387** 903-08
- Murakami M, Narazaki M, Hibi M, Yawata H, Yasukawa K, Hamaguchi M, Taga T and Kishimoto T** (1991) Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is

conserved in the cytokine receptor family *Proc Natl Acad Sci U S A* **88** 11349-53

Murakami T, Yamashita T, Iida M, Kuwajima M and Shima K (1997)

A short form of leptin receptor performs signal transduction *Biochem Biophys Res Commun* **231** 26-9

Murphy BD (2000) Models of luteinization *Biol Reprod* **63** 2-11

Murphy BD, Gevry N, Ruiz-Cortés T, Cote F, Downey BR and Sirois J

(2001) Formation and early development of the corpus luteum in pigs *Reproduction Supplement* **58** 47-63

Nakashima K, Narazaki M and Taga T (1997) Overlapping and distinct signals through leptin receptor (OB-R) and a closely related cytokine signal transducer, gp130 *FEBS Lett* **401** 49-52

O'Rourke L and Shepherd PR (2002) Biphasic regulation of extracellular-signal-regulated protein kinase by leptin in macrophages:role in regulating STAT3 Ser 727 phosphorylation and DNA binding *Biochem. J* **364** 875-879

Park HY, Kwon HM, Lim HJ, Hong BK, Lee JY, Park BE, Jang Y, Cho SY, Kim HS (2001) Potential role of leptin in angiogenesis: leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro *Exp Mol Med* **33** 95-102

Pescador N, Soumano K, Stocco DM, Price CA and Murphy BD (1996)

Steroidogenic acute regulatory protein in bovine corpora lutea *Biol Reprod* **55** 485-91

Pescador N, Stocco DM and Murphy BD (1999) Growth factor modulation of steroidogenic acute regulatory protein and luteinization in the pig ovary *Biol Reprod* **60** 1453-61

Pilon N, Daneau I, Brisson C, Ethier J-F, Lussier JG and Siversides DW (1997) Porcine and bovine steroidogenic acute regulatory

(StAR) protein gene expression during gestation *Endocrinology* **138** 1085-91

- Porte DJ, Seeley RJ, Woods SC, Baskin DG, Figlewics DP and Schwartz MW** (1998) Obesity, diabetes and the central nervous system *Diabetologia* **41** 863-81
- Prunier A and Quesnel H** (2000) Influence of the nutritional status on ovarian development in female pigs *Anim Reprod Sci* **60-61** 185-97
- Redmer DA and Reynolds LP** (1996) Angiogenesis in the ovary *Rev Reprod* **1** 182-92
- Reynolds LP, Grazul-Bilska AT and Redmer DA** (2000) Angiogenesis in the corpus luteum *Endocrine* **12** 1-9
- Rosenblum CI, Tota M, Cully D, Smith T, Collum R, Qureshi S, Hess JF, Phillips MS, Hey PJ, Vongs A, Fong TM, Xu L, Chen HY, Smith RG, Schindler C and Van der Ploeg LH** (1996) Functional STAT 1 and 3 signaling by the leptin receptor (OB-R); reduced expression of the rat fatty leptin receptor in transfected cells *Endocrinology* **137** 5178-81.
- Schneider JE, Zhou D and Blum RM** (2000) Leptin and metabolic control of reproduction *Horm Behav* **37** 306-26
- Schoonjans K, Gelman L, Haby C, Briggs M and Auwerx J** (2000) Induction of LPL gene expression by sterols is mediated by a sterol regulatory element and is independent of the presence of multiple E boxes *J Mol Biol* **304** 323-34
- Schwartz MW, Peskind E and Raskind M** (1996) Cerebrospinal fluid leptin levels: Relationship to plasma levels and to adiposity in humans *Nature Medicine* **2** 589-93

- Schwartz MW, Prigeon RL and Kahn SE**(1997) Evidence that plasma leptin and insulin levels are associated with body adiposity via different mechanisms *Diabetes care* **20** 1476-81
- Seeley RJ, van Dijk G and Campfield LA**(1997) Intraventricular leptin reduces food intake and body weight of lean rats but not Zucker obese rats *Horm Metab Res* **28** 664-68
- Seufert J, Kieffer TJ, Leech CA, Holz GG, Moritz W, Ricordi C and Habener JF** (1999) Leptin suppression of insulin secretion and gene expression in human pancreatic islets: implications for the development of adipogenic diabetes mellitus *J Clin Endocrinol Metab* **84** 670-6
- Shea-Eaton WK, Trinidad MJ, Lopez D, Nackley A and McLean MP** (2001) Sterol regulatory element binding protein-1a regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene *Endocrinology* **142** 1525-33
- Shimomura I, Matsuda M and Hammer RE** (2000) Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice *Mol Cell* **6** 77-86
- Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, Garcia-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB, Polverini PJ and Flores-Riveros JR** (1998) Biological action of leptin as an angiogenic factor *Science* **281** 1683-6
- Smith GD, Jackson LM and Foster DL** (2002) Leptin regulation of reproductive function and fertility *Theriogenology* **57** 73-86

Soukas A, Cohen P, Socci ND and Friedman JM (2000) Leptin-specific pattern of gene expression in white adipose tissue *Gen. Dev.* **14** 963-80

Spicer LJ and Francisco CC (1997) The adipose obese gene product, leptin: evidence of a direct inhibitory role in ovarian function *Endocrinology* **138** 3374-9

Spicer LJ and Francisco CC (1998) Adipose obese gene product, leptin, inhibits bovine ovarian thecal cell steroidogenesis *Biol Reprod* **58** 207-12

Spicer LJ, Chamberlain CS and Francisco CC (2000) Ovarian action of leptin: effects on insulin-like growth factor-I- stimulated function of granulosa and thecal cells *Endocrine* **12** 53-9.

Spicer LJ (2001) Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction *Domestic Animal Endocrinology* **21** 251-70

Stephens TW and Caro JF (1998) To be lean or not to be lean. Is leptin the answer? *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **106** 1-15

Stocco DM and Sodeman TC (1991) The 30-kDa mitochondrial proteins induced by hormone stimulation in MA-10 mouse Leydig tumor cells are processed from larger precursors *J Biol Chem* **266** 19731-38

Sugawara T, Holt JA, Driscoll D, Strauss III JF, Lin D, Miller WL, Patterson D, Clancy KP, Hart IM, Clark BJ and Stocco DM (1995) Human steroidogenic acute regulatory protein: functional activity in COS-1 cells, tissue-specific expression, and mapping of the structural gene to 8p11.2 and a pseudogene to chromosome 13 *Proc Natl Acad Sci USA* **92** 4778-82

Takaya K, Ogawa Y, Isse N, Okazaki T, Satoh N, Masuzaki H, Mori K, Tamura N, Hosoda K and Nakao K (1996) Molecular cloning of rat leptin receptor isoform complementary DNAs-- identification

of a missense mutation in Zucker fatty (fa/fa) rats *Biochem Biophys Res Commun* **225** 75-83

Tanabe K, Okuya S, Tanizawa Y, Matsutani A, Oka Y (1997) Leptin induces proliferation of pancreatic beta cell line MIN6 through activation of mitogen-activated protein kinase *Biochem Biophys Res Commun* **241** 765-8

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT and Deeds J (1995) Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R *Cell* **83** 1263-71

Tartaglia LA (1997) The leptin receptor *J Biol Chem* **272** 6093-6

Tena-Sempere M, Manna PR, Zhang FP, Pinilla L, Gonzalez LC, Dieguez C, Huhtaniemi I and Aguilar E (2001) Molecular mechanisms of leptin action in adult rat testis: potential targets for leptin-induced inhibition of steroidogenesis and pattern of leptin receptor messenger ribonucleic acid expression *J Endocrinol* **170** 413-23.

Tontonoz P, Kim JB, Graves RA and Spiegelman BM (1993) ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation *Mol Cell Biol* **13** 4753-59

Tsuchiya T, Shimizu H, Horie T, Mori M (1999) Expression of leptin receptor in lung: leptin as a growth factor *Eur J Pharmacol* **365** 273-9

Uotani S, Bjorbaek C, Tornoe J and Flier JS (1999) Functional properties of leptin receptor isoforms: internalization and degradation of leptin and ligand-induced receptor downregulation *Diabetes* **48** 279-86

- Wang MY, Zhou YT, Newgard CB and Unger RH** (1996) A novel leptin receptor isoform in rat *FEBS Lett* **392** 87-90
- White DW, Kuropatwinski KK, Devos R, Baumann H and Tartaglia LA** (1997) Leptin receptor (OB-R) signaling. Cytoplasmic domain mutational analysis and evidence for receptor homo-oligomerization *J Biol Chem* **272** 4065-71
- Wolf G, Hamann A, Han DC, Helmchen U, Thaiss F, Ziyadeh FN, Stahl RA** (1999) Leptin stimulates proliferation and TGF-beta expression in renal glomerular endothelial cells: potential role in glomerulosclerosis *Kidney Int* **56** 860-72
- Woller M, Tessmer S, Neff D, Nguema AA, Roo BV and Waechter-Brulla D** (2001) Leptin stimulates gonadotropin releasing hormone release from cultured intact hemihypothalami and enzymatically dispersed neurons *Exp Biol Med (Maywood)* **226** 591-6
- Yamashita T, Murakami T, Otani S, Kuwajima M and Shima K** (1998) Leptin receptor signal transduction: OBRa and OBRb of fa type *Biochem Biophys Res Commun* **246** 752-9
- Young KH, Kraeling RR and Bazer FW** (1990) Effect of pregnancy and exogenous ovarian steroids on endometrial prolactin receptor ontogeny and uterine secretory response in pigs *Biol Reprod* **43** 592-9
- Yu WH, Kimura M, Walezewska A, Karanth A, McCann SM** (1997) Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. *Proc Natl Acad Sci* **94** 1023-1028
- Zachow RJ and Magoffin DA** (1997) Direct intraovarian effects of leptin: impairment of the synergistic action of insulin-like growth factor-I on follicle-stimulating hormone- dependent estradiol-17 beta production by rat ovarian granulosa cells *Endocrinology* **138** 847-50

- Zachow RJ, Weitsman SR and Magoffin DA (1999)** Leptin impairs the synergistic stimulation by transforming growth factor-beta of follicle-stimulating hormone-dependent aromatase activity and messenger ribonucleic acid expression in rat ovarian granulosa cells *Biol Reprod* **61** 1104-9
- Zamorano PL, Mahesh VB, De Sevilla LM, Chorch LP, Bhat GK and Brann DW (1997)** Expression and localization of the leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissues of the rat *Neuroendocrinology* **65** 223-8
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L and Friedman JM (1994)** Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue *Nature* **372** 425-32
- Zhang Y, Olbort M, Schwarzer K, Nusslein-Hildesheim B, Nicolson M, Murphy E, Kowalski TJ, Schmidt I and Leibel RL (1997)** The leptin receptor mediates apparent autocrine regulation of leptin gene expression *Biochem Biophys Res Commun* **240** 492-5
- Zhou YT, Wang ZW, Higa M, Newgard CB and Unger RH (1999)** Reversing adipocyte differentiation: implications for treatment of obesity *Proc Natl Acad Sci USA* **96** 2391-95